

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**POLIMORFISMOS EN EL GEN *para* DEL CANAL DE SODIO DEPENDIENTE DE
VOLTAJE DE *Aedes aegypti* (L.) EN MÉXICO Y SU IMPACTO EN LA
RESISTENCIA A PIRETROIDES**

Por

LBG. ANDRE GABRIEL CASTRO BAUTISTA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN ENTOMOLOGÍA MÉDICA Y VETERINARIA

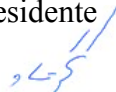
2021

**POLIMORFISMOS EN EL GEN *para* DEL CANAL DE SODIO DEPENDIENTE
DE VOLTAJE DE *Aedes aegypti* (L.) EN MÉXICO Y SU IMPACTO EN LA
RESISTENCIA A PIRETROIDES**

Comité de Tesis



Dra. Beatriz López Monroy
Presidente



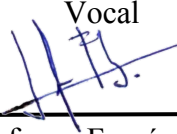
Dr. Gustavo Ponce García
Secretario



Dra. Adriana E. Flores Suárez
Vocal



Dr. Humberto Quiroz Martínez
Vocal



Dr. Ildefonso Fernández Salas
Vocal




Dra. Katiushka Arévalo Niño
Subdirector de Posgrado



**DIRECCIÓN
DE POSGRADO**

POLIMORFISMOS EN EL GEN *para* DEL CANAL DE SODIO DEPENDIENTE DE
VOLTAJE DE *Aedes aegypti* (L.) EN MÉXICO Y SU IMPACTO EN LA
RESISTENCIA A PIRETROIDES

Director de Tesis



Dra. Beatriz López Monroy

Director

DERECHOS RESERVADOS©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue financiado por el programa SEP-CONACYT Ciencia Básica
CB2017-2018, con clave No. A1-S-8456

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento otorgando en el proyecto: “Coevolución de mutaciones en el gen *para* del canal de sodio dependiente de voltaje de *Aedes aegypti* en México” apoyado por el Fondo Sectorial de Investigación para la educación SEP-CONACYT Ciencia Básica CB2017-2018, con clave No. A1-S-8456.

De nuevo al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología gracias por la beca otorgada durante estos dos increíbles años, sin la cual no hubiese podido culminar mis estudios de posgrado.

A la Dra. Beatriz López Monroy, gracias su dirección este proyecto y darme la oportunidad de participar en él.

Al Dr. Gustavo Ponce García, por su amistad, por todo el conocimiento tanto dentro como fuera del aula. Y sobre todo gracias por la experiencia de vida en campo.

A la MC. Selene Gutiérrez, gracias por su amistad y enseñanza en el laboratorio.

A la Dra. Adriana Flores por su compartir su conocimiento y experiencia en el área.

A mi amigo Kevin, por su amistad incondicional, todas las alegrías y experiencias vividas antes y durante la maestría.

Al Laboratorio de Entomología Médica, FCB UANL; por ser una segunda casa para mi durante estos años.

DEDICATORIA

Especialmente dedicado a mis padres: Mérida Bautista y Gustavo Castro, por apoyarme en todas mis metas y siempre estar presentes en mi vida.

A mis hermanos: Gustavo y Emiliano.

No importa que tan lejos estemos, siempre estaré para ustedes. Los amo infinitamente.

A mi novia y compañera incondicional Cecilia Martínez, por todo su apoyo, comprensión y amor durante este camino. Te amo

A mis Abuelos: Basi Martínez, Gabino Bautista y Flavia Castillo. Siempre los llevo en mi corazón.

A mis gatos: Mancha, y Queso.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Biología de <i>Aedes aegypti</i>	3
2.2 El papel de <i>Aedes aegypti</i> en la transmisión de enfermedades arbovirales	4
2.3 Manejo de <i>Aedes aegypti</i>	5
2.3.1 Insecticidas piretroides en el control químico de <i>Aedes aegypti</i> y su modo de acción	6
2.4 Resistencia a insecticidas piretroides en <i>Aedes aegypti</i>	8
2.4.1 Métodos de monitoreo de la resistencia	8
2.4.1.1 Bioensayos	8
2.4.1.2. Ensayos bioquímicos y moleculares	10
2.4.2 Identificación de los mecanismos de resistencia	11
2.5 Polimorfismos en el gen <i>para</i> del canal de sodio dependiente de voltaje y su papel en la resistencia a insecticidas en <i>Ae. aegypti</i>	12
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVOS	18
5.1 Objetivo General	18
5.2 Objetivos específicos	18
6. MATERIALES Y MÉTODOS	19
6.1 Área de estudio	19
6.2 Establecimiento de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i>	19
6.3 Calculo de la Dosis de derribo y letal media (DK ₅₀ y DL ₅₀) en <i>Ae. aegypti</i> mediante ensayos biológicos de botella con bifentrina y deltametrina	20
6.3.1 Insecticidas	20
6.3.2 Preparación de soluciones madre de los insecticidas bifentrina (99%) y deltametrina (99.5%)	20
6.3.3 Preparación de las botellas con el insecticida	21

6.3.4 Preparación del material biológico para bioensayos	21
6.3.5 Interpretación de los resultados	22
6.4 Búsqueda de polimorfismos en el gen que codifica para el canal de sodio dependiente de voltaje de <i>Ae. aegypti</i>	23
6.4.1 Extracción de ADN a partir de <i>Ae. aegypti</i>	23
6.4.2 Asociación de polimorfismos en el gen para del canal de sodio dependiente de voltaje (vgsc) de <i>Ae. aegypti</i> con la resistencia a piretroides	24
6.4.3 Amplificación de los loci 410, 1016, 1534 del canal de sodio dependiente de voltaje (vgsc) de <i>Ae. aegypti</i>	24
6.4.4 Determinación de las frecuencias genotípicas y alélicas	26
6.5 Análisis estadístico	27
7. RESULTADOS	28
7.1 Susceptibilidad a piretroides en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de México	28
7.1.1 Susceptibilidad a bifentrina en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de México ...	28
7.1.2 Susceptibilidad a deltametrina en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de México.....	29
7.2 Polimorfismos y sus frecuencias en el vgsc de <i>Ae. aegypti</i> con los fenotipos: activos, recuperados y muertos después de la exposición a la CL50 de bifentrina y deltametrina	31
7.3 Genotipificación de mosquitos seleccionados por fenotipo (activos, recuperados y muertos), después de la exposición a bifentrina	32
7.4 Asociación entre la frecuencia de los polimorfismos y los resultados de bioensayos con bifentrina	36
7.5 Genotipificación de mosquitos seleccionados por fenotipo (activos, recuperados y muertos), después de la exposición a deltametrina	40
7.6 Asociación entre la frecuencia de los polimorfismos y los resultados de bioensayos con deltametrina	44
7.7 Coocurrencia de las mutaciones kdr F1034C, V1016I y V410L en mosquitos expuestos a bifentrina	48
7.8 Coocurrencia de las mutaciones kdr F1534C, V1016I y V410L en mosquitos	

expuestos a deltametrina	50
7.9. Relación entre la frecuencia de los polimorfismos kdr y la resistencia a bifentrina y deltametrina en <i>Aedes aegypti</i> de México	52
8. DISCUSIÓN	56
9. CONCLUSIONES	68
10. PERSPECTIVAS	69
11. BIBLIOGRAFIA	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Métodos de monitoreo de resistencia, ventajas y desventajas	10
Tabla 2. Colecciones de <i>Aedes aegypti</i>	19
Tabla 3. Directrices de la OMS para la definición de derribo y mortalidad	22
Tabla 4. Concentración de derribo media (CK ₅₀) calculada en cada población de <i>Ae. aegypti</i> bajo estudio en respuesta a la exposición a bifentrina	28
Tabla 5. Concentración letal media (CL ₅₀) calculada en cada población de <i>Ae. aegypti</i> bajo estudio en respuesta a la exposición a bifentrina.....	29
Tabla 6. Concentración de derribo media (CK ₅₀) calculada en cada población de <i>Ae. aegypti</i> bajo estudio en respuesta a la exposición a deltametrina.....	30
Tabla 7. Concentración letal media (CL ₅₀) calculada en cada población de <i>Ae. aegypti</i> bajo estudio en respuesta a la exposición a deltametrina.....	30
Tabla 8. Porcentaje de la frecuencia genotípica de las mutaciones kdr en los loci 1534, 1016 y 410 en poblaciones <i>Ae. aegypti</i> después de la exposición a bifentrina....	34
Tabla 9. Porcentaje de la frecuencia alélica de las mutaciones kdr en los loci 1534, 1016 y 410 en poblaciones <i>Ae. aegypti</i> después de la exposición a bifentrina.....	35
Tabla 10. Asociación de los loci 410, 1016 y 1534 con los fenotipos activos, muertos y recuperados, después de la exposición a la CL ₅₀ de bifentrina en poblaciones categorizadas como de resistencia baja con baja y alta recuperación	37
Tabla 11. Asociación de los loci 410, 1016 y 1534 con los fenotipos activos, muertos y recuperados, después de la exposición a la CL ₅₀ de bifentrina en poblaciones categorizadas como de resistencia moderada con baja y alta recuperación	38
Tabla 12. Asociación de los loci 410, 1016 y 1534 con los fenotipos activos, muertos y recuperados, después de la exposición a la CL ₅₀ de bifentrina en poblaciones categorizadas como de resistencia alta con baja y alta recuperación	39
Tabla 13. Porcentaje de la frecuencia genotípica de las mutaciones kdr en los loci 1534, 1016 y 410 en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> después de la exposición a deltametrina	41
Tabla 14. Porcentaje de la frecuencia alélica de las mutaciones kdr en los loci 1534, 1016 y 410 en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> después de la exposición a	

Deltametrina	42
Tabla 15. Asociación de los loci 410, 1016 y 1534 con los fenotipos activos, muertos y recuperados, después de la exposición a la CL50 de deltametrina en poblaciones categorizadas como de resistencia baja con baja y alta recuperación (Tablas de contingencia 3x3).....	45
Tabla 16. Asociación de los loci 410, 1016 y 1534 con los fenotipos activos, muertos y recuperados, después de la exposición a la CL50 de deltametrina en poblaciones categorizadas como de resistencia moderada con baja y alta recuperación (Tablas de contingencia 3x3).....	46
Tabla 17. Asociación de los loci 410, 1016 y 1534 con los fenotipos activos, muertos y recuperados, después de la exposición a la CL50 de deltametrina en poblaciones categorizadas como de resistencia alta con baja y alta recuperación (Tablas de contingencia 3x3).....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de <i>Aedes aegypti</i> (macho)	3
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Ae. aegypti</i>	4
Figura 3. Transmisión de arbovirus a través de <i>Ae. aegypti</i>	5
Figura 4. Canal de sodio dependiente de voltaje afectado por piretroides	7
Figura 5. Ubicación física de las mutaciones V410L, S989, V1016I, F1534C, T1520I y D1763Y en el canal de sodio dependiente de voltaje	15
Figura 6. Porcentaje de mosquitos seleccionados por fenotipo después de la exposición a la CL ₅₀ calculada de bifentrina en cada población	31
Figura 7. Porcentaje de mosquitos seleccionados por fenotipo después de la exposición a la CL ₅₀ calculada de deltametrina en cada población	32
Figura 8. Frecuencia del alelo mutado I1016 en mosquitos seleccionados por fenotipo después de la exposición a la CL ₅₀ calculada para cada población con bifentrina	36
Figura 9. Frecuencia del alelo mutado L410 en mosquitos seleccionados por fenotipo después de la exposición a la CL ₅₀ calculada para cada población, con bifentrina	36
Figura 10. Frecuencia del alelo mutado I1016 en mosquitos seleccionados por fenotipo después de la exposición a la CL ₅₀ calculada para cada población, con deltametrina	43
Figura 11. Frecuencia del alelo mutado L410 en mosquitos seleccionados por fenotipo después de la exposición a la CL ₅₀ calculada para cada población, con deltametrina	43
Figura 12. Coocurrencia de las mutaciones kdr en sus diferentes combinaciones tri locus presentes en las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> bajo estudio expuestas a bifentrina.....	49
Figura 13. Coocurrencia de las mutaciones kdr en sus diferentes combinaciones	

tri locus presentes en las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> bajo estudio expuestas a deltametrina	51
Figura 14. Relación entre A) RRCK50 y tri-loci mutado CC/II/LL en activos (azul) y recuperados (morado); B) RRCL50 y tri-loci mutado CC/II/LL en activos (azul) y muertos (verde), en poblaciones expuestas a bifentrina	52
Figura 15. Relación entre A) RRCK50 y alelo mutado II1016; B) RRCK50 y genotipo mutado II1016; C) RRCK50 y genotipo heterocigoto VI1016; D) RRCL50 y alelo mutado II1016; E) RRCL50 y genotipo mutado II1016; F) RRCL50 y genotipo heterocigoto VI1016; en poblaciones expuestas a deltametrina	53
Figura 16. Relación entre A) RRCK50 y tri-loci mutado CC/II/LL en activos; B) RRCK50 y tri-loci mutado CC/II/LL en Recuperados (azul) y muertos (verde); C) RRCK50 y genotipo CC/VI/VL en activos; D) RRCL50 y tri-loci mutado CC/II/LL en activos; E) RRCL50 y tri-loci mutado CC/II/LL en Recuperados (azul) y muertos (verde); F) RRCL50 y genotipo CC/VI/VL en activos; en poblaciones expuestas a deltametrina	54

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

Ae: *Aedes*

para: gen que codifica para la proteína del canal de sodio dependiente de voltaje

vgsc: Voltage gated sodium channel

kdr: knock down resistance

RR: Razón de Resistencia

CL₅₀: Concentración letal media

CK₅₀: Concentración media de derribo

C1534: Alelo mutado del locus 1534

L410: Alelo mutado del locus 410

I1016: Alelo mutado del locus 1016

RESUMEN

Aedes aegypti (L.) es el vector principal de enfermedades arbovirales como el dengue, zika, chikungunya y fiebre amarilla, para las que en su mayoría no se cuenta con tratamientos específicos y vacunas efectivas. Las estrategias actuales para el control de *Ae. aegypti* se basan en el uso de insecticidas, lo cual genera un rápido aumento de la resistencia. El uso continuo y generalizado de insecticidas a base de piretroides ha creado una gran presión de selección particularmente para uno de los mecanismos moleculares de resistencia, mutaciones puntuales en el gen *para* del canal de sodio dependiente de voltaje (vgsc), denominadas kdr por el efecto fenotípico de resistencia al derribo en los individuos que las poseen.

De acuerdo con lo anterior, en el presente trabajo se estudió el estado de la susceptibilidad de poblaciones *Aedes aegypti* de México a los insecticidas piretroides bifentrina y deltametrina, relacionando esta con los polimorfismos en el gen *para* del canal de sodio dependiente de voltaje. Se encontró alta resistencia a bifentrina y deltametrina en las poblaciones bajo estudio, con valores RRCL₅₀ entre 11 – 31 y 20 – 126, respectivamente.

A partir de ensayos moleculares en la búsqueda de polimorfismos en el vgsc de hembras *Ae. aegypti* previamente expuestas a los insecticidas mencionados e identificado su fenotipo, se encontraron las mutaciones V410L, V1016I y F1534C.

Se encontró, además que el alelo C1534 esta presente en el 100% de los mosquitos analizados, mientras que los alelos mutados I1016 y L410 se encuentran en más del 75% de los fenotipados activos.

Al evaluar la relación entre la frecuencia de los polimorfismos estudiados y los resultados de los ensayos biológicos, se encontró que la resistencia observada en las poblaciones bajo estudio se explica con la alta frecuencia de homocigotos triple mutados encontrados en los mosquitos con fenotipo activo.

ABSTRACT

Aedes aegypti (L.) is the primary mosquito vector of arboviral diseases such as dengue, Zika and chikungunya, for which do not have specific treatments or effective vaccines. Current strategies for the control of *Ae. aegypti* are based on the use of insecticides, which generates a rapid increase in resistance. Particularly, the continuous and widespread use of pyrethroids has created an important selection pressure for one of the molecular mechanisms of resistance, point mutations in the voltage-gated sodium channel (vgsc) gen, called kdr for the phenotypic effect of resistance to knockdown in individuals who possess them.

The goal of the current study in to determine the susceptibility status of *Aedes aegypti* populations from Mexico to the pyrethroid insecticides bifenthrin and deltamethrin, relating this to the polymorphisms in vgsc gene.

Our results confirm the high resistance to bifenthrin and deltamethrin in populations under study, with RRCL50 values between 11 - 31 and 20 - 126, respectively.

From molecular tests of *Ae. aegypti* previously exposed to insecticides and classified according to their phenotype as active, dead, and recovered, mutations V410L, V1016I and F1534C were found. The C1534 allele is present in 100% of the analyzed mosquitoes, while the I1016 and L410 mutated alleles were found in more than 75% of the active phenotypes.

When evaluating the relationship between the frequency of the studied polymorphisms and the results of biological tests, it was found that the resistance observed in the populations under study is explained by the high frequency of triple mutated homozygotes found in mosquitoes with an active phenotype.

1. INTRODUCCIÓN

Aedes aegypti (L.) en México y en todo el mundo es el principal vector de enfermedades arbovirales, tales como la fiebre amarilla, dengue (DENV), chikunguya (CHIKV) y zika (ZIKV). Estos arbovirus son transmitidos en un ciclo urbano o semiurbano entre los humanos y el mosquito *Ae. aegypti*, el cual se encuentra ampliamente domesticado, y puede alimentarse de la sangre de varios individuos durante un ciclo gonotrófico. De las anteriores enfermedades mencionadas, el dengue es la enfermedad arboviral que de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud se presenta en una tasa de 50-100 millones de infecciones todo el mundo cada año y aproximadamente 2,500 millones de personas viven con el riesgo de transmisión (Kandel et al. 2019).

En las últimas décadas, los casos de dengue han aumentado significativamente (Yaméogo et al. 2019) siendo endémico en más de 120 países y ha sido clasificado como la enfermedad viral transmitida por mosquitos más importante (Kushwah et al. 2015). En México, los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV1-4) están presentes en la mayoría de los estados del país, por lo que el control y la prevención de esta enfermedad están dirigidas al vector y se basan principalmente en una combinación de estrategias tales como la reducción de los sitios de reproducción del vector mediante la eliminación mecánica de criaderos artificiales y la aplicación de insecticidas incluidos organofosforados, carbamatos y piretroides, que se usan ampliamente en el control de mosquitos adultos (Li et al. 2015).

Los insecticidas piretroides actúan sobre el canal de sodio dependiente de voltaje (*para*) causando la despolarización, lo que interrumpe la señalización en el sistema nervioso, produce una parálisis rápida y la muerte de los mosquitos, esto conocidos como "derribo" (Yaméogo et al. 2019). *Ae. aegypti* ha desarrollado un tipo de resistencia a los piretroides causada por mutaciones puntuales en el gen *para* del canal de sodio dependiente de voltaje, llamadas mutaciones *kdr* "knock down resistance" o mutaciones de resistencia al derribo, estas mutaciones incluyen G923V, L982W, I1011 M y V1016G identificados por primera vez en 2003; I1011V y V1016I en 2007, D1763Y en 2009, S989P y F1534C en 2010, T1520I en 2015 y V410L en 2017 (Saavedra et al. 2018, 2019).

De acuerdo con lo anterior, en el presente estudio se pretende determinar sistemáticamente la variabilidad genética encontrada en el gen que codifica para el canal de sodio dependiente de voltaje a través de la búsqueda de polimorfismos en poblaciones *Ae. aegypti* de México, la frecuencia con la que estos se presentan y validar su importancia en la resistencia a los insecticidas bifentrina y deltametrina, a través de bioensayos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Biología de *Aedes aegypti*

Aedes aegypti es un mosquito de coloración oscura, con franjas plateadas en sus patas y una estructura en forma de lira, también plateada, sobre el tórax (Figura 1). Los individuos de esta especie poseen una metamorfosis completa o bien, holometábola, ya que su desarrollo comprende 4 fases: huevo, larva, pupa y adulto. El ciclo de vida completo, desde huevo hasta adulto toma aproximadamente entre 8 a 10 días dependiendo directamente de la temperatura del agua y ambiente en el que se encuentre (Gómez 2018).

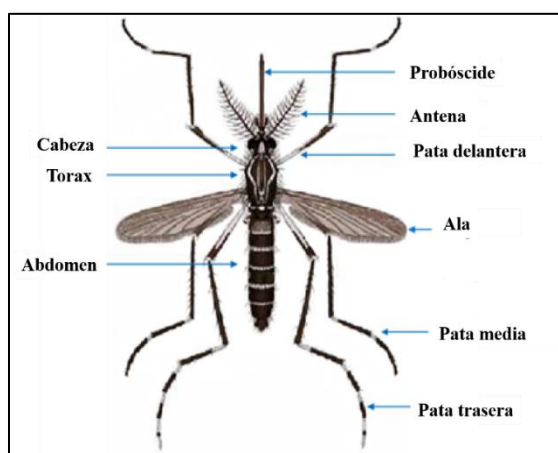


Figura 1. Morfología de *Aedes aegypti* (macho). Modificada de OECD, 2018.

Las hembras de *Aedes aegypti* ponen sus huevos en las paredes laterales (justo por encima de la superficie del agua) de cuerpos de agua estancados naturales (estanques, pantanos, agujeros de árboles, etc.) y contenedores de almacenamiento de agua utilizados en y alrededor de los hogares (floreros, neumáticos, cubetas, cisternas, etc.). Los huevos pueden permanecer viables hasta varios meses esperando que el agua los cubra y alcancen una temperatura adecuada para su eclosión, generalmente ocurre dentro de 2-4 días. Las larvas comprenden 4 estadios y se transforman en pupas dentro de 4-6 días y las pupas eventualmente se convierten en mosquitos adultos en 1-3 días (Figura 2) (Arias et al. 2015).

El segundo día después de la emergencia, los mosquitos adultos pueden copular. Cada mosquito hembra puede tener hasta 6 ciclos gonotróficos a lo largo de su vida útil, y pueden ocurrir múltiples oviposiciones durante el mismo ciclo gonotrófico (Arias et al. 2015).

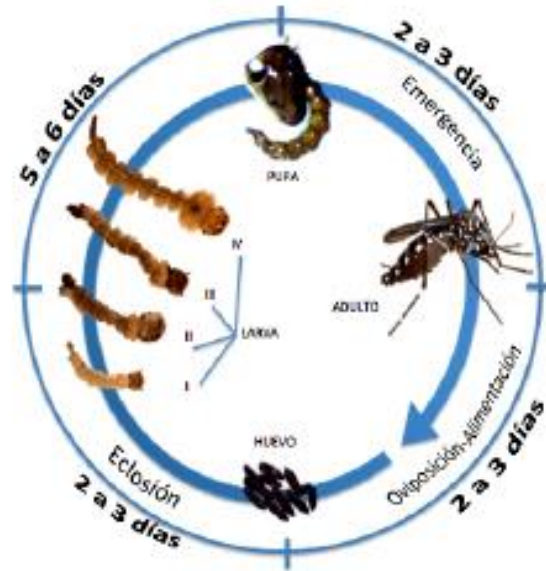


Figura 2. Ciclo de vida de *Ae. aegypti*. (CENAPRECE, 2014).

2.2 El papel de *Aedes aegypti* en la transmisión de enfermedades arbovirales

Aedes aegypti es una especie de mosquito antropofílico con una distribución mundial en zonas climáticas tropicales, subtropicales y templadas. Es el principal vector de la fiebre amarilla, virus del dengue, chikungunya y Zika; estrechamente asociado con el hábitat humano (Kandel et al. 2019). Los mosquitos *Ae. aegypti* son activos durante el día, y la mayor parte de la actividad de picadura ocurre temprano en la mañana o al final de la tarde (Vontas et al. 2012).

El mosquito es infectado por medio de su alimentación sanguínea, al ingerir la sangre de una persona portadora de alguno de los arbovirus ya mencionados, y se vuelve infeccioso después de un período obligatorio de incubación extrínseca de 10 a 12 días (Figura 3). Una vez que el mosquito se vuelve infeccioso, puede tener la capacidad de transmitir las diferentes arbovirosis al ingerir sangre de una persona susceptible (Rigau-pérez et al. 1998). En ausencia de una vacuna o medicamentos terapéuticos efectivos, el control del

vector sigue siendo la única estrategia disponible para controlar y prevenir la transmisión de arbovirosis (Mulyaningsih et al. 2018).

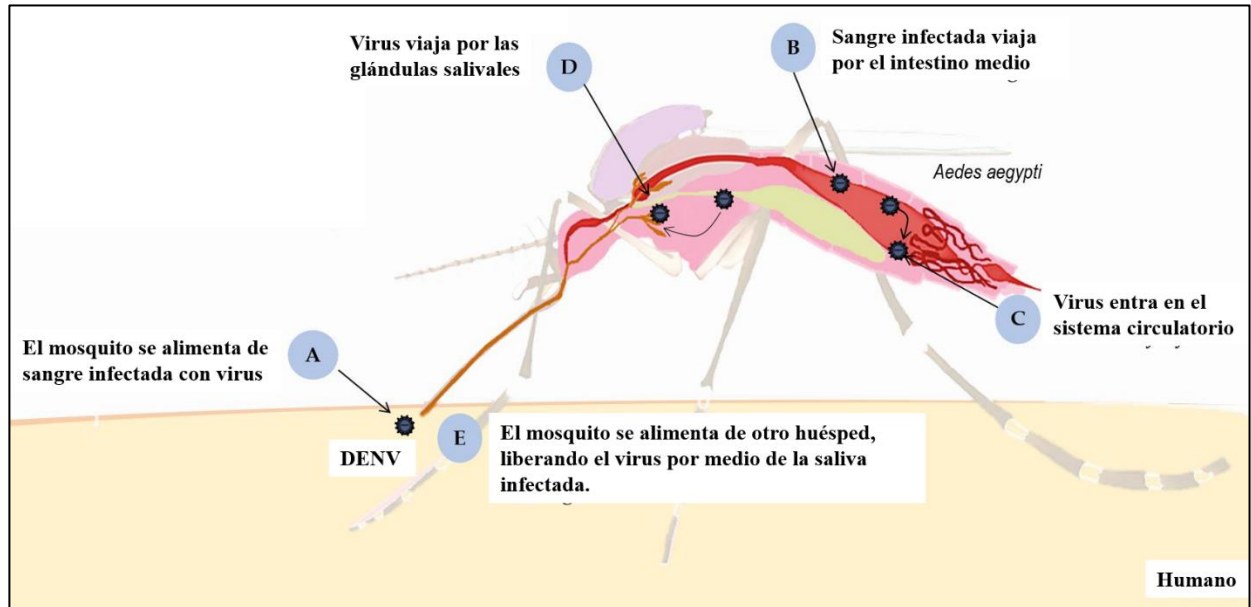


Figura 3. Transmisión de arbovirus a través de *Ae. aegypti*. Modificado de Vinícius et al. (2019).

2.3 Manejo de *Aedes aegypti*

Los mosquitos *Ae. aegypti* en todo el mundo son los principales vectores del virus del dengue, fiebre amarilla y zika, las estrategias para el manejo de estas enfermedades se centran en el control de las poblaciones del vector (Vera-Maloof et al. 2015). Actualmente en México las acciones para controlar las poblaciones de *Ae. aegypti* se sustentan en: a) el control químico de los estados inmaduros y la eliminación física de los criaderos, b) el control químico de los mosquitos adultos mediante insecticidas en tratamientos espaciales y rociado intradomiciliario focal, y c) estrategias de promoción de la salud y participación comunitaria patio limpio y cuidado del agua almacenada (Chauzat y Faucon 2007).

Estas medidas para el manejo de *Ae. aegypti* son en concordancia con la Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2014 (DOF 2015), Para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores. Esta norma tiene por objeto establecer las especificaciones, criterios y procedimientos para disminuir

el riesgo de infección, enfermedad, complicaciones o muerte por enfermedades transmitidas por vector.

Un método de control apropiado es la eliminación de las fuentes de agua y criaderos, para lo que se ha recomendado el manejo ambiental permanente, que tiene como objetivo modificar físicamente el entorno donde se desarrolla y vive el mosquito para prevenir y minimizar la propagación del dengue a través del contacto vector-humano, a partir de la variante de manipulación ambiental con cambios físicos temporales como el manejo de los criaderos con tapado, volteado, almacenaje, lavado, reciclaje y correcta disposición de llantas usadas (Barrera-Pérez et al. 2015).

El control químico con insecticidas orgánicos e inorgánicos es uno de los métodos adoptados como parte del manejo integrado del vector en Salud Pública. Existen 4 clases principales de insecticidas neurotóxicos utilizados en el control de mosquitos, lo cuales son: organoclorados, organofosfatos, carbamatos y piretroides; estos últimos tienen la ventaja de ser altamente activos a dosis bajas (Oliveira et al. 2017). El control y la prevención del dengue se basan principalmente en el manejo de vectores, utilizando los insecticidas químicos organofosforados y los piretroides para el rociado espacial y materiales impregnados para protección personal (Sombié et al. 2019).

2.3.1 Insecticidas piretroides en el control químico de *Aedes aegypti* y su modo de acción

Los piretroides constituyen un grupo de compuestos químicos que están estructuralmente modificados del piretro natural y están clasificados por dos tipos principales. La mayoría de los piretroides de primera generación son agentes de derribo, pero poco efecto en la mortalidad; mientras que los piretroides de segunda generación poseen un alto efecto en la mortalidad (Mulyaningsih et al. 2018). Los piretroides sintéticos son actualmente los insecticidas más utilizados para el control de mosquitos de importancia médica (Itokawa et al. 2019).

Este grupo de insecticidas se une al canal de sodio dependiente de voltaje previniendo su transición del estado activo (conductancia iónica) a inactivo (sin conductancia) (Figura 4).

Como resultado de esto, ocurre una despolarización completa de la membrana axonal, paralizando al insecto y ocasionándole la muerte (Field et al. 2017).

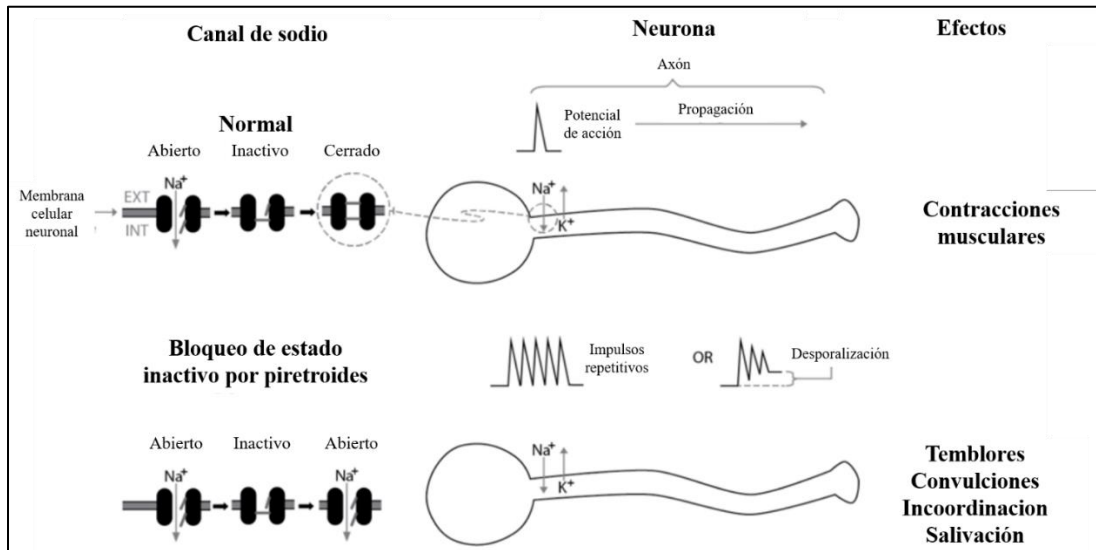


Figura 4. Canal de sodio dependiente de voltaje afectado por piretroides. Modificado de Hénault-Ethier, Louise (2016).

Desde 1950, los programas operativos de control de vectores en México han utilizado una serie de insecticidas para controlar los vectores de mosquitos y reducir la transmisión de arbovirus y malaria. Entre 1950 y 1960, el insecticida organoclorado DDT se usó ampliamente en México para la pulverización residual en interiores de hogares y en 1998 todavía se usó para el control de la malaria en algunas regiones del país. Posteriormente, el organofosforado (OP) malatión, se usó ampliamente como adulticida para la pulverización espacial de volumen ultra bajo (ULV) desde 1981 a 1999. Los insecticidas piretroides (PYR) han jugado un papel global importante en el control de *Ae. aegypti* adultos, utilizados mediante rociado residual, mosquiteros impregnados o rociado espacial a menudo en combinación con el insecticida organofosforado temefos para controlar los estadios inmaduros (Ponce et al. 2009).

En el 2000, de acuerdo con la NOM-032-SSA2-2002 (DOF 2003) los programas de control de vectores en México cambiaron a insecticidas basados en permetrina para el control de adultos. Esto ha proporcionado una presión de selección prolongada e intensa para la evolución de la resistencia en *Ae. aegypti*. Los insecticidas piretroides con ingredientes

activos como la permetrina, deltametrina, resmetrina y sumitrina hoy en día se aplican comúnmente en todo el mundo para el control de mosquitos adultos y reducir la carga de enfermedades transmitidas por mosquitos. Tan solo durante 2007, se utilizaron 60.944 kg de ingrediente activo PYR para el control de enfermedades transmitidas por vectores, lo que demuestra el uso generalizado de esta clase de insecticida en todo el país (Aponte et al. 2013).

2.4 Resistencia a insecticidas piretroides en *Aedes aegypti*

2.4.1 Métodos de monitoreo de la resistencia

La resistencia a insecticidas es el resultado de la selección ejercida por estos que permite a algunos insectos con características genéticas particulares el poder sobrevivir a dosis que la mayoría de los individuos de la población no (Flores et al. 2014). Esta resistencia puede ser definida como la habilidad complementaria y hereditaria propia de un individuo o conjunto de ellos, que los capacita fisiológica y etológicamente, para bloquear la acción tóxica de un insecticida y, en consecuencia, sobrevivir a la exposición de dosis que para otros sería letal. El desarrollo de tal resistencia es un proceso complejo y dinámico dependiente de muchos factores, por lo que el manejo de esta requiere dos tipos de información: un programa de monitoreo y un buen conocimiento de los mecanismos de resistencia. El tener un monitoreo rutinario de la resistencia a insecticidas en las poblaciones de vectores naturales nos ayuda a detectar la resistencia temprana y mejorar la eficacia de las estrategias de control operacional. Mientras que la caracterización de los mecanismos de resistencia involucrados nos permite apreciar y predecir su impacto en las estrategias de control de vectores.

2.4.1.1 Bioensayos

De entre los métodos utilizados en el monitoreo de la resistencia se encuentran los ensayos biológicos (métodos OMS y CDC), ensayos con sinergistas, pruebas bioquímicas y moleculares, las cuales en conjunto permiten orientar la elección del insecticida a utilizar para controlar la población de un vector en caso de detectar resistencia (Chen et al. 2021).

Desde 1960, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha propuesto la estandarización de bioensayos para detectar la resistencia de los insectos a los insecticidas. De acuerdo con las directrices de la OMS, la resistencia puede detectarse y controlarse mediante bioensayos utilizando dos métodos: dosis diagnóstico y estimación de la razón de resistencia (RR) por dosis-respuesta (Da Graça Macoris et al. 2005). La dosis se llama "diagnóstico" porque permite discriminar entre individuos susceptibles (aquellos que mueren después de la exposición) y los resistentes (los que sobreviven a la exposición). La tasa de mortalidad en un ensayo de dosis diagnóstico indica el estado de la población cuando se prueba en un número significativo con suficientes repeticiones. Se clasifica como población de insectos "susceptibles" si presentan 98-100% de mortalidad y "resistentes" a la mortalidad por debajo del 80 (OMS 2017).

Otro de los métodos comúnmente utilizado para el monitoreo de la resistencia es el bioensayo en botella adoptado por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC), que es una herramienta de vigilancia para detectar cambios en la susceptibilidad a los insecticidas en las poblaciones de mosquitos vectores. Este método permite la evaluación simultánea de la susceptibilidad de cualquier población de mosquitos a diferentes insecticidas, incluso aquellos de diferentes grupos toxicológicos, de una manera simple, rápida y económica (López et al. 2018).

En los bioensayos dosis-respuesta se mide la respuesta de los insectos, sometidos a un amplio rango de dosis del insecticida de interés. El análisis de dosis-respuesta resultante proporciona resultados como las concentraciones (o tiempos de exposición) que matan el 50% o el 90% de las muestras. Este método permite el cálculo de las relaciones de resistencia para cuantificar y comparar la resistencia entre poblaciones de campo contra una población susceptible; sin embargo, esta prueba lleva más tiempo y requiere gran cantidad de mosquitos, por lo que no se realiza con tanta frecuencia (Ryan et al. 2019).

2.4.1.2. Ensayos bioquímicos y moleculares.

Además de los bioensayos, las técnicas de análisis bioquímicos permiten detectar mecanismos de resistencia y, junto con los ensayos moleculares, deben formar parte de un enfoque global para controlar la resistencia (Tabla 1). Los ensayos bioquímicos y moleculares pueden detectar mecanismos de resistencia en insectos individuales y, por lo tanto, facilitan la confirmación de los sobrevivientes de las pruebas de bioensayo (Da Graça Macoris et al. 2005).

La información obtenida de estas pruebas, combinada con los resultados de las pruebas biológicas utilizando sinergistas y ensayos bioquímicos y moleculares, como la detección de mutaciones kdr, puede ayudar a determinar qué insecticida debe usarse para controlar la población de un vector en los casos en que se detecta resistencia (López et al. 2018).

Tabla 1. Métodos de monitoreo de resistencia, ventajas y desventajas (Dusfour et al. 2019).

Métodos	Ventajas	Desventajas
<u>Ensayos biológicos</u>		
Ensayos de dosis diagnóstico	Estandarizado	Falta de sensibilidad
	Simple y rápido de realizar	No hay información sobre el nivel o tipo de resistencia.
	Detectar fenotipo de resistencia	Requiere insecticidas de calidad universal
		Requerir mosquitos vivos
Ensayos de dosis-respuesta	Medir niveles de resistencia	Requiere gran cantidad de mosquitos vivos
		Requerir una colonia de referencia susceptible
Ensayos con sinergistas	Información sobre los posibles mecanismos responsables de la resistencia.	Falta de sensibilidad y especificidad.
		Requiere gran cantidad de mosquitos vivos
<u>Ensayos bioquímicos de actividad enzimática</u>	Información sobre los mecanismos responsables de la resistencia.	Requiere una cadena de frío
	Varios mecanismos probados en un solo individuo	No disponible para todos los mecanismos de resistencia.
		Falta de sensibilidad / especificidad
<u>Ensayos moleculares para detectar alelos resistentes.</u>	Muy sensible	Requiere equipo especializado y costoso
	Varios mecanismos probados en individuos solteros	Solo disponible para un número limitado de mecanismos de resistencia.
	Detectar alelos recesivos y proporcionar una "alerta temprana" de resistencia futura.	No siempre se vinculan fácilmente con los niveles de resistencia.

2.4.2 Identificación de los mecanismos de resistencia

Los mecanismos de resistencia a los insecticidas contra mosquitos se dividen en dos grandes categorías: 1) por desintoxicación metabólica y 2) por mutaciones en las proteínas objetivo del insecticida que hacen que estas proteínas sean menos susceptibles a los insecticidas correspondientes (Kasai et al. 2016).

La resistencia a los insecticidas evoluciona fácilmente en las poblaciones de insectos cuando se exponen prolongadamente al mismo insecticida o insecticidas con el mismo modo de acción (Kandel et al. 2019). *Ae. aegypti* ha desarrollado resistencia a los piretroides, mediante mecanismos metabólicos y por mutaciones kdr no sinónimas en el canal de sodio dependiente de voltaje (vgsc). Estas mutaciones alteran la estructura del canal de sodio, de tal manera que hay una afinidad disminuida hacia los piretroides. La evolución de la resistencia a estos y otros insecticidas en *Ae. aegypti* puede comprometer la efectividad de los programas de control (Sombié et al. 2019).

La resistencia mediada por desintoxicación metabólica abarca modificaciones en una secuencia de ADN que influye en la expresión de un grupo complejo de enzimas, lo que lleva a una reacción aumentada en el proceso de desintoxicación de los insecticidas. Este mecanismo de resistencia les permite a los mosquitos resistentes metabolizar los insecticidas antes de que ocurran los efectos tóxicos e involucra enzimas como las oxidasas de función mixta (MFO), las glutatión-S-transferasas (GST) y las esterasas (EST). Este mecanismo de resistencia se ha confirmado en poblaciones de vectores en las cuatro clases principales de insecticidas ampliamente utilizados para el control de vectores que incluye piretroides, carbamatos, organofosforados y organoclorados.(Amelia-Yap et al. 2019)

Por otro lado, la resistencia al derribo (knock down resistance o kdr), se refiere al mecanismo de resistencia a piretroides y DDT, en el que los insectos no pierden inmediatamente la coordinación después de la exposición al insecticida (Alvarez et al. 2015). Estas mutaciones ocurren en el gen *para* que codifica el canal de sodio dependiente de voltaje (vgsc) que se expresa en axones de células nerviosas y que es el objetivo principal de los piretroides (Kasai et al. 2016). Estas mutaciones kdr generalmente se limitan a áreas geográficas específicas y la coocurrencia de ciertas mutaciones es un

fenómeno que se ha asociado con niveles altos de resistencia fenotípica (Saavedra et al. 2018).

Para evaluar la resistencia por desintoxicación metabólica, se puede medir la actividad o cuantificar la cantidad de enzimas de desintoxicación (esterasas, monooxigenasas y glutatión-S transferasas), mediante ensayos bioquímicos en poblaciones silvestres, comparando los resultados con una cepa susceptible de referencia. En estas pruebas, se aplica un sustrato específico a los extractos enzimáticos, y los productos del metabolismo del sustrato se cuantifican mediante una reacción colorimétrica utilizando un espectrofotómetro (Dusfour et al. 2019).

Por otro lado, para el monitoreo y la detección de mutaciones *kdr* asociadas con resistencia a piretroides y DDT en *Ae. aegypti*, se han desarrollado herramientas de diagnóstico robustas. Estos ensayos basados en PCR se pueden realizar en mosquitos individuales, lo que permite la estimación de frecuencias de alelos en múltiples poblaciones. Estos métodos moleculares pueden ser de utilidad al integrarlos en programas de monitoreo de resistencia. Las herramientas de diagnóstico molecular de alto rendimiento asociadas con ensayos biológicos pueden proporcionar datos clave para identificar las causas de la resistencia a fin de implementar estrategias adecuadas de manejo de la resistencia (Dusfour et al. 2019).

2.5 Polimorfismos en el gen *para* del canal de sodio dependiente de voltaje y su papel en la resistencia a insecticidas en *Ae. aegypti*

Existen diversos polimorfismos o sustituciones de aminoácidos específicas en la estructura del canal de sodio dependiente de voltaje (vgsc), que resultan en insensibilidad objetivo en insectos resistentes. Alrededor de 57 mutaciones no sinónimas en el vgsc se han asociado con la insensibilidad del canal; curiosamente, la convergencia de las mutaciones de resistencia a la caída (*kdr*) en diferentes géneros de insectos valida el importante papel de este mecanismo (Mulyaningsih et al. 2018).

La resistencia desarrollada contra los piretroides, conocida como resistencia al derribo (*kdr*), se informó por primera vez en mosca doméstica, *Musca domestica*, en la década de 1950. Actualmente, se ha encontrado que las mismas sustituciones aminoacídicas, así como

varias otras sustituciones de aminoácidos están asociadas con la resistencia en muchas plagas de insectos de importancia médica y agrícola (Itokawa et al. 2019)

El canal de sodio en dípteros son proteínas con 24 dominios transmembranales organizados en cuatro dominios (I-IV), cada uno con seis segmentos que abarcan la membrana. Varias mutaciones puntuales en el gen *para* de *Aedes aegypti* se han implicado en la resistencia a los piretroides (Kandel et al. 2019).

A nivel mundial, se han identificado once mutaciones en el canal de sodio dependiente de voltaje (*para*) en *Ae. aegypti* y, en la mayoría de los casos, se han relacionado con conferir cierto grado de resistencia a los piretroides (Figura 5). Estas mutaciones incluyen G923V, L982W, I1011 M y V1016G identificados por primera vez en 2003; I1011V y V1016I en 2007, D1763Y en 2009, S989P y F1534C en 2010, T1520I en 2015 y V410L en 2017 (Saavedra et al. 2018, 2019).

En México, poblaciones de campo de *Ae. aegypti* han sido reportadas con por lo menos tres mutaciones en el gen *para*, V1016I en el dominio II; que está ligada a la supervivencia ante exposición a permetrina, F1534C en el dominio IV; que reduce la unión a permetrina a los canales de sodio y la mutación V410L en el dominio I; que se identificó en colecciones de 2002 a 2016 de *Ae. aegypti* en México, y se determinó su relación directa con la resistencia a los piretroides. Las poblaciones que tenían este genotipo portaban también las mutaciones F1534C y V1016I a diferentes frecuencias (Saavedra et al. 2018). V410L también se ha detectado en otras poblaciones de *Ae. aegypti* en el continente sudamericano, como en Brasil y Colombia (Villanueva et al. 2019).

Hasta la fecha, solo se han encontrado dos mutaciones kdr en África: V1016I y F1534C. La mutación V1016I es común en América (Kandel et al. 2019). Mientras que la mutación F1534C tiene una distribución mundial y ha sido reportada ampliamente en distintas partes del mundo, pero con una frecuencia mucho más alta que V1016I (Yaméogo et al. 2019).

La mutación F1534C a menudo ocurre sola, y su asociación con la resistencia a la permetrina piretroide tipo I se ha establecido in vitro y en estudios de campo. Sin embargo, la asociación de la mutación V1016I sola con resistencia a los piretroides no se ha establecido claramente; tanto en México como en Brasil, la coincidencia de los alelos

resistentes I1016I y I1534C es común y probablemente impulsada por la presión de selección por piretroides (Sombié et al. 2019).

La sustitución de valina por leucina en el codón 410 del canal de sodio dependiente de voltaje en *Ae. aegypti* fue descrita por primera vez en Brasil por Haddi et al. (2017), quienes informaron una afinidad reducida a los piretroides tipo I (permetrina) y tipo II (deltametrina). En estudios recientes, Saavedra et al. (2018) demostraron en bioensayos en botella con 25 µg de permetrina que los mosquitos con el genotipo homocigoto resistente L410 mostraron solo el 7% de mortalidad, el 64% en los mosquitos heterocigotos y el 90% en los mosquitos homocigotos V410, lo que demuestra la importancia de la mutación en la posición 410.

En México, la mutación L410 se informó por primera vez en 2017 (Saavedra et al. 2018), también se determinó que la mutación ha estado presente en las poblaciones de México desde 2002 y que su frecuencia ha ido en aumento desde entonces.

Estudios previos han determinado la coocurrencia de las mutaciones F1534C y V1016I en México (Lopez et al. 2018), donde se informa la fijación del alelo C1534 en poblaciones de *Ae. aegypti* de Monterrey, Guadalupe, Poza Rica, Coatzacoalcos, Minatitlán, Mérida y Umán, mientras que las frecuencias de I1016 en estos mismos lugares varían entre 0.13 y 0.73 (Villanueva et al. 2019). Hasta la fecha, se han encontrado trece mutaciones kdr en *Ae. aegypti* en todo el mundo (Chen et al. 2021).

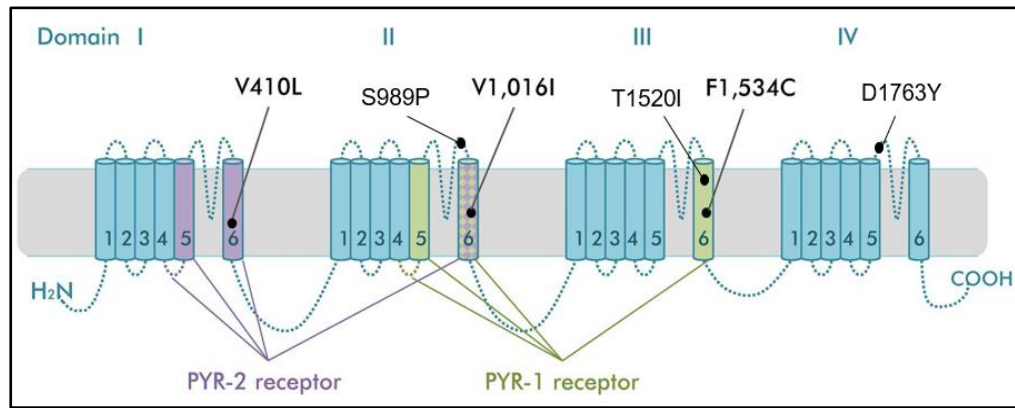


Figura 5. Ubicación física de las mutaciones V410L, S989P, V1016I, F1534C, T1520I y D1763Y en el canal de sodio dependiente de voltaje. Se muestran los segmentos de dominio y las hélices de interconexión que forman los sitios del receptor piretroide 1 (verde) y 2 (morado). Modificado de Saavedra et al. (2018).

3. JUSTIFICACIÓN

Aedes aegypti, el vector transmisor de enfermedades arbovirales como el dengue, chikungunya, fiebre amarilla y zika, continúa siendo un problema en los países tropicales y al no existir un tratamiento específico, la principal estrategia para la disminución en el número de casos es el control de las poblaciones del vector.

En México, actualmente la NOM-032-SSA2-2014 establece los lineamientos en materia de vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores, donde una de las herramientas más utilizadas para el control de *Ae. aegypti* es el control químico. Sin embargo, si no se tiene un monitoreo de la susceptibilidad de las poblaciones a controlar, el intenso uso de insecticidas permite el desarrollo de la resistencia en estas.

El desarrollo de la resistencia es un proceso complejo y dinámico que depende de múltiples factores. Por lo tanto, su gestión requiere dos tipos de información: un programa de monitoreo de las poblaciones naturales del vector y conocer sobre los mecanismos que causan la resistencia. Este monitoreo e identificación de los mecanismos de resistencia permitirá detectar resistencia temprana, mejorar la efectividad de las estrategias de control operacional y predecir sus impactos.

La importancia del presente estudio estriba en la identificación de polimorfismos presentes en el gen *para* del canal de sodio dependiente de voltaje, determinar su frecuencia e impacto en la resistencia a insecticidas piretroides en poblaciones de *Ae. aegypti* en México, a fin de que la información generada pueda ser referencia en los programas de manejo del vector *Ae. aegypti* en México, lo cual permitirá el uso eficiente de los recursos disponibles para el control de este y la subsecuente disminución de las poblaciones del mismo.

4. HIPÓTESIS

Los polimorfismos en el gen *para* del canal de sodio dependiente de voltaje y su frecuencia en poblaciones *Ae. aegypti* de México se relacionan con resultados en bioensayos de botella con los insecticidas piretroides bifentrina y deltametrina.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Determinar la relación entre los polimorfismos en el gen *para* del canal de sodio dependiente de voltaje y la frecuencia de estos en poblaciones *Ae. aegypti* de México con los resultados de bioensayo de botella con los insecticidas piretroides bifentrina y deltametrina.

5.2 Objetivos específicos

- Calcular las concentraciones letales medias (CL₅₀) mediante bioensayos de botella con los insecticidas piretroides bifentrina y deltametrina en poblaciones *Ae. aegypti* de México.
- Calcular la Razón de Resistencia (RR) a partir de las CL₅₀ calculadas para los insecticidas piretroides bifentrina y deltametrina en poblaciones *Ae. aegypti* de México en relación con las calculadas en la cepa susceptible New Orleans.
- Determinar los polimorfismos en el gen *para* del canal de sodio dependiente de voltaje a partir de los fenotipos: activos (resistentes al derribo), recuperados y muertos después de su exposición a la CL₅₀ de bifentrina y la CL₅₀ de deltametrina en poblaciones *Ae. aegypti* de México.
- Evaluar la relación entre la frecuencia de polimorfismos en el gen *para* del canal de sodio dependiente de voltaje en poblaciones *Ae. aegypti* de México y los resultados de bioensayos de botella con los insecticidas piretroides bifentrina y con deltametrina.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Área de estudio

Se utilizaron colecciones de *Aedes aegypti* provenientes de los estados que se enlistan en la Tabla 2. Adicionalmente se utilizó la cepa de Nueva Orleans como cepa de referencia susceptible.

Tabla 2. Colecciones de *Aedes aegypti*.

ESTADO	POBLACIÓN	Coordenadas
New Orleans	Susceptible	
Sinaloa	Guasave	N 25°34'8.1" W 108°28'6.8"
	Villa Unión	N 23°11'15.1" W 106°12'58.9"
Chiapas	Tuxtla	N 16°45'16.1" W 93°8'31.47"
	La Palma	N 14°55'51.9" W 92°19'28.7"
Tamaulipas	Reynosa	N 26°04'37.4" W 98°21'42.5"
	Rio Bravo	N 25°59'18.9" W 98°4'19.3"
Nuevo Leon	Monterrey	N 25°41'50.8" W 100°17'8.3"
	Linares	N 24°52'4.02" W 99°33'13.5"
Veracruz	Catemaco	N 18°25'45.1" W 95°07'18.7"
	Coatzacoalcos	N 18°39'44.6" W 91°49'06.1"
	Pánuco	N 22°03'29.9" W 98°11'12.6"
Yucatan	Mérida	N 21°01'32.3" W 89°34'97.2"
	Valladolid	N 20°52'23.6" W 89°45'08.2"
Campeche	Champotón	N 19°19'37.8" W 90°43'39.7"
	Cd. del Carmen	N 18°37'03.6" W 91°44'32.1"

6.2 Establecimiento de las poblaciones de *Ae. aegypti*

Se establecieron las colonias de mosquitos a partir de larvas de *Ae. aegypti* que se recolectaron de criaderos artificiales al aire libre como neumáticos, cubetas, frascos y otros recipientes. Las larvas fueron transportadas al laboratorio de Entomología Médica de la Facultad de Ciencias Biológicas UANL y mantenidas en todas las etapas de vida en condiciones de laboratorio a $28^{\circ} \pm 1^{\circ}$ C, $68 \pm 4\%$ de humedad relativa y fotoperíodo de 12:12 horas (L: D). En fase larvaria fueron alimentados con extracto de hígado bovino en

polvo (Liver poder MP Biomedicals, LLC) al 50% disuelto en agua y los contenedores fueron lavados de 2 a 3 veces por semana. Posteriormente se colocaron las pupas en cámaras de emergencia hasta que emergieron los adultos para su identificación, una vez que los individuos se confirmaron como *Ae. aegypti* se pasaron con ayuda de un aspirador, a jaulas de 30 X 30 cm s. Los mosquitos macho fueron alimentados con una solución de azúcar al 10% y las hembras tuvieron una alimentación sanguínea utilizando ratas (*Rattus norvegicus*). Para una superficie de oviposición, hubo recipientes de plástico (250 ml) con agua, dentro de jaulas los cuales que contenían papel de filtro en su interior. Estos huevos correspondieron a la generación F1 los cuales fueron utilizados para los ensayos biológicos y moleculares.

6.3 Calculo de la Dosis de derribo y letal media (DK₅₀ y DL₅₀) en *Ae. aegypti* mediante ensayos biológicos de botella con bifentrina y deltametrina.

6.3.1 Insecticidas

Los insecticidas utilizados fueron de grado técnico: bifentrina (99%) y deltametrina (99.5%) (ChemService, West Chester).

6.3.2 Preparación de soluciones madre de los insecticidas bifentrina (99%) y deltametrina (99.5%)

Se preparo una solución madre de cada insecticida diluyéndolo en acetona de grado técnico y sobre la base de la concentración inicial de insecticida se prepararon las diluciones necesarias para obtener un rango de dosis que nos permitiera calcular la concentración letal media (CL₅₀). Las diluciones se prepararon utilizando la siguiente ecuación:

$$C1V1=C2V2$$

Donde,

C1: concentración inicial de insecticida

V1: volumen de insecticida que se añade a la dilución.

C2: concentración final de la dilución

V2: volumen final de la dilución

6.3.3. Preparación de las botellas con el insecticida

Los bioensayos se realizaron siguiendo el protocolo de Brogdon y McAllister (1998) en botellas Wheaton® de 250 ml. El proceso se realizo en una cámara de escape de humos BIOBASE. Asegurándonos de que las botellas estuvieran completamente secas, se agregó el volumen requerido de la solución de insecticida para obtener la dosis deseada e inmediatamente se agregó 1ml de acetona.

Se prepararon 5 concentraciones seriadas buscando obtener porcentajes de derribo y mortalidad entre el 8 y 92% en cada caso. Para cada dosis de cada insecticida se realizaron 3 réplicas y una botella control (solo solvente). Cada botella se cerró y se agito colocándolas en un rotador de botellas Wheaton® para garantizar una cobertura uniforme. Las botellas se colocaron durante 24 horas en un lugar oscuro a temperatura ambiente para permitir que se secaran.

6.3.4. Preparación del material biológico para bioensayos

Se utilizaron hembras F1 de cada población bajo estudio y de la población de referencia (Cepa New Orleans) sin alimentación sanguínea de 3 a 5 días de edad, mantenidas con solución azucarada al 10% y con interrupción de alimentación 6h previo al bioensayo. Los bioensayos se llevaron a cabo a 28 ± 1 ° C con $79 \pm 7\%$ de humedad relativa.

Se depositaron un total de 20 mosquitos hembra en cada botella tratada y control durante 1 h. Se contabilizaron los mosquitos derribados y se registraron cada 10 minutos hasta completar la hora de exposición. Transcurrido este tiempo, los moquitos serán transferidos a vasos de recuperación en donde se les proporciono solución azucarada depositada en algodón, para 24 horas después realizar el registro de la mortalidad.

El criterio de derribo y mortalidad a utilizar fue el establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) el cual se haya descrito en la Tabla 2. De acuerdo con la OMS, se considerará derribado a cualquier mosquito que; 1) no pueda pararse, 2) no pueda volar de

manera coordinada, 3) yace sobre su dorso moviendo patas y alas sin poder despegar, 4) que pueda pararse y despegar, pero cae inmediatamente y 5) sin señales de vida o inmóvil.

Tabla 3. Directrices de la OMS para la definición de derribo y mortalidad.

Vivo	Derribo después de 60 minutos o muerto después de 24 horas de exposición	
	Moribundo	Muerto
Puede pararse y volar de manera coordinada.	<ul style="list-style-type: none"> • Cualquier mosquito que no pueda pararse (por ejemplo, tiene 1 o 2 patas) • Cualquier mosquito que no pueda volar de manera coordinada. • Un mosquito que yace sobre su dorso, moviendo las patas y las alas, pero sin poder despegar. • Un mosquito que puede pararse y despegar brevemente, pero se cae inmediatamente. 	No hay señales de vida; inmóvil; no puede levantarse

Fuente: Página 77 de 15th WHOPES WG report (2012):
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75304/1/9789241504089_eng.pdf

La mortalidad del control fue considerada. Si la mortalidad de control fue $\geq 20\%$, las pruebas fueron descartadas. Cuando la mortalidad de control fue $< 20\%$, la mortalidad observada se corrigió utilizando la fórmula de Abbott (1925), de la siguiente manera:

$$\text{Mortalidad corregida} = \frac{\% \text{ Mortalidad observada} - \% \text{ mortalidad del control}}{100 - \% \text{ mortalidad del control}} \times 100$$

Si la mortalidad de control fue $< 5\%$, no fue necesaria la corrección de los resultados de la prueba, mientras que la mortalidad de $\geq 5\%$ si requirió corrección.

6.3.5 Interpretación de los resultados

Con el registro de derribo a la hora de exposición, se calculó el porcentaje de derribo, mientras que con los datos de mortalidad a las 24 horas de exposición se calcularon los porcentajes de mortalidad. Lo anterior se llevó a cabo en hojas de cálculo de Microsoft Excel.

El cálculo de la concentración de derribo media (CK₅₀) se estimó partir de una línea de regresión de derribo logarítmica-probit usando el programa estadístico SPSS. Los

intervalos de confianza fueron calculados con una $\alpha = 0.05$ y se determinó la diferencia significativa entre los valores con base al traslape de los mismos. De igual forma que se hizo con la CL_{50} , pero en este caso a partir de la línea de regresión de mortalidad.

Se calculó, además, la razón de resistencia (RR) tanto para la CK_{50} como para la CL_{50} , dividiendo en cada caso lo obtenido de la población de campo entre los resultados de la cepa susceptible. Se interpretaron los resultados como $RR < 5$ considerado susceptible, $RR = 5 - 10$, resistencia moderada y $RR > 10$ alta resistencia (Mazzarri & Georghiou, 1995).

6.4. Búsqueda de polimorfismos en el gen que codifica para el canal de sodio dependiente de voltaje de *Ae. aegypti*

6.4.1. Extracción de ADN a partir de *Ae. aegypti*

El ADN se extrajo individualmente de 35 mosquitos adultos hembra F0 de las poblaciones recolectadas en los estados ya mencionados. El protocolo utilizado fue la técnica de extracción de sales (Coen, 1982). Los mosquitos fueron macerados individualmente en 100µl de buffer de extracción (0.1M NaCl, 0.2M sacarosa, 0.1 Tris-HCl pH 9.1, 0.005M EDTA y 0.5% de dodecilsulfato de sodio- SDS) utilizando pistilos Kontex en tubos eppendorf de 1.5ml. Posteriormente se centrifugaron durante 2 min a 14,000 rpm y se incubaron durante 30 minutos a 65°C. Transcurrido este tiempo se agregó a cada tubo 15µl de acetato de potasio y se colocó a -20°C por al menos 30min con la finalidad de que precipitará el SDS. Posteriormente se centrifugo a 14,000 rpm durante 15 min y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo donde se procedió a realizar los lavados con etanol al 100% y 70%. Finalmente, y obtenido el pellet de ADN se secó durante 2 min a 65°C y se Resuspendió en 50 µl de agua (Cellgro®, agua purificada estéril, grado de biología molecular). La concentración y la calidad de cada muestra de ADN se determinó en un equipo NanoDrop 2000 spectrophotometer (Rhode Island, USA).

6.4.2. Asociación de polimorfismos en el gen para el canal de sodio dependiente de voltaje (vgsc) de *Ae. aegypti* con la resistencia a piretroides

Para la asociación de los polimorfismos en vgsc y la resistencia a piretroides se seleccionó el material biológico mediante ensayos de botella, las cuales fueron impregnadas con la CL₅₀ calculada para cada población para cada uno de los 2 insecticidas a evaluar.

Se expusieron mosquitos hembra de cada población de 1 a 5 días de edad y sin alimentación sanguínea a la CL₅₀ calculada en estas. Después de 1 h de exposición se separó el material en vasos de recuperación divididos en 2 grupos: activos (resistentes al derribo) e inactivos.

Para asegurar la categoría en la que fueron ubicados, 4 horas después de la exposición se confirmó el estado de los mosquitos, si los mosquitos eran capaces de volar se le consideraba resistentes al derribo. Mientras que los mosquitos del fenotipo inactivo se separaron nuevamente como recuperados y muertos.

6.4.3. Amplificación de loci 410, 1016, 1534 del canal de sodio dependiente de voltaje (vgsc) de *Ae. aegypti*.

Para los loci 410, 1016 y 1534, sitios ya identificados en los que mutaciones puntuales están asociadas con la resistencia, se realizó PCR punto final en un termociclador BioRad iCycler T100 (BioRad, Hercules, CA), en los mosquitos seleccionados por fenotipo: activos (resistentes al derribo), recuperados y muertos.

Los oligonucleótidos específicos para la detección de los alelos silvestres y mutados se sintetizaron de acuerdo con lo publicado por Saavedra et al. (2007), Yanola et al. (2011) y Saavedra-Rodríguez et al. (2019) respectivamente, mientras que las condiciones de reacción y termociclado se realizaron de acuerdo con lo reportado por Villanueva et al. (2019) y López et al. (2018).

La PCR para V1016I se llevó a cabo en una mezcla de reacción de 15 µl que contuvo 1.25 µl de buffer (10X, Invitrogen, Carlsbad, CA), MgCl₂ 1.5 mM, dNTP 0.2 mM, 5 µM de cada oligonucleótido, 100 ng de ADN genómico y 2 U Taq polimerasa (Invitrogen). La reacción para V1016I se realizó de la siguiente manera: la temperatura se mantuvo a 95°C

durante 5 minutos para la separación inicial de las cadenas de ADN, seguida de 29 ciclos de 95°C (1 minuto), 60°C (1 minuto) y 72°C (1 min 15 s) y 72°C durante 10 minutos para la extensión final.

Para la amplificación de F1534C la PCR se llevó a cabo en una mezcla de reacción de 15 µl que contuvo 1.25 µl de buffer (10X, Invitrogen), MgCl₂ 1.5 mM, dNTP 0.1 mM, 0.5 µM de cada oligonucleótido, 100 ng de ADN genómico y 1 U Taq polimerasa (Invitrogen). Las condiciones de la PCR fueron de 95°C durante 4 minutos para la separación inicial de las cadenas de ADN, seguido de 35 ciclos de 95°C (1 minuto), 57°C (1 minuto) y 72°C (1 min s) y 72°C durante 4 minutos para la extensión final.

Para la amplificación de V410L la PCR se llevó a cabo en una mezcla de reacción de 25 µl, que contuvo 12.50 µl de GoTaq (Promega, Madison, WI) se mezclaron con 11.35 µl de H₂O sin nucleasas (NFW, Promega) y 1 µM de cada uno de los oligonucleótidos. Las condiciones para la PCR fueron las siguientes: 3 min a 95 ° C para la separación inicial de las cadenas, seguido de 30 ciclos a 95 ° C (1 min), 56 ° C (20 seg) y a 72 ° C (20 seg), seguido de 5 min a 72 ° C para la extensión final.

En todos los ensayos de PCR se utilizó un tubo que contuvo la mezcla de todos los componentes, excepto el ADN genómico, para posteriormente distribuir la mezcla en tubos de PCR y agregar el ADN genómico (100 ng) de cada individuo. Además, se incluyeron tres controles cada vez que se realizó la PCR; se utilizó un control susceptible homocigoto silvestre (cepa New Orleans), un control homocigoto mutante resistente y agua como control negativo.

Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 3 % (Agarose Ultrapure, Invitrogen), respectivamente, a 110 V durante 1 h usando un buffer de hidróxido de sodio (SB 1X buffer: 200 mM NaOH, pH 8,0, y ácido bórico) y el agente intercalante gel Red (Biotium, Hayward, CA), visualizados bajo luz ultravioleta (UV) y fotografiados en un transiluminador (UVITEC Cambridge). En el primer carril del gel se colocó paralelo

con las muestras un marcador de ADN de peso molecular conocido (Molecular Weight Marker, DNA 25 bp Ladder, AMRESCO®) y posteriormente muestras y controles.

6.4.4 Determinación de frecuencias genotípicas y alélicas

Se analizaron 100 mosquitos de cada población y se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas. Las frecuencias genotípicas (f) fueron calculadas mediante la división del número total de individuos con el genotipo a calcular entre el total de mosquitos analizados mediante la siguiente ecuación:

$$f(AA) = \text{número de individuos } AA/N$$

$$f(Aa) = \text{número de individuos } Aa/N$$

$$f(aa) = \text{número de individuos } aa/N$$

Donde:

(AA)-genotipo homocigoto dominante

(Aa)- genotipo heterocigoto

(aa) - genotipo homocigoto recesivo

N- número total de individuos analizados

Las frecuencias alélicas se calcularon mediante la ecuación:

$$p = f(A) = f(AA) + 1/2 f(Aa)$$

$$q = f(a) = f(aa) + 1/2 f(Aa)$$

Donde:

(AA)- genotipo homocigoto dominante

(Aa)- genotipo heterocigoto

(aa)- genotipo homocigoto recesivo

Se calcularon además los intervalos de confianza 95% utilizando el intervalo de Wald, el cual es determinado adicionando la mitad del cuadrado del valor crítico Z (1.96) para el numerador y el cuadrado del valor crítico en el denominador antes de calculado el intervalo.

6.5. Análisis estadístico

Se realizaron tablas de contingencia 3x3 para evaluar la asociación de los insecticidas deltametrina y bifentrina entre los fenotipos: resistente al derribo, recuperado y muerto después de la exposición a cada insecticida con los genotipos: homocigoto mutante, homocigoto silvestre y heterocigoto en cada locus por separado y para las combinaciones genotípicas resultantes, esto mediante una prueba de X^2 con un nivel de significancia $p \leq 0.05$. Además, se llevó a cabo un análisis de regresión entre las RR y las frecuencias alélicas y genotípicas determinadas en cada caso (R^2 , $p \leq 0.05$). Para dichos análisis se utilizaron Microsoft Excel, GraphPad Prism 7 y IBM SPSS statistics 23.

7. RESULTADOS

7.1. Susceptibilidad a piretroides en poblaciones de *Ae. aegypti* de México

7.1.1 Susceptibilidad a bifentrina en poblaciones de *Ae. aegypti* de México

Se determinó la concentración de derribo media (CK₅₀) y la concentración letal media (CL₅₀) de cada una de las poblaciones de *Ae. aegypti* bajo estudio, después de la exposición al insecticida bifentrina (Tablas 4 y 5). Luego de comparar estos valores con los calculados en la población susceptible New Orleans, se encontraron razones de resistencia (RR) en un rango de 8.8 a 28.2 para la CK₅₀ y de 11.1 a 31 para la CL₅₀. De acuerdo con estos resultados todas las poblaciones estudiadas son resistentes al insecticida bifentrina con RR > 10 (Mazzarri y Georghiou 1995). Los valores CL₅₀ mayores se encontraron en la población de Panuco, Veracruz seguida de Cd. del Carmen, Campeche con 5.3 µg/botella y 4.9 µg/botella, respectivamente (Tabla 5).

Tabla 4. Concentración de derribo media (CK₅₀) calculada en cada población de *Ae. aegypti* bajo estudio en respuesta a la exposición a bifentrina

ESTADO	POBLACIÓN	CK ₅₀ (µg/botella)	Límite inferior	Límite superior	RR	N
	New Orleans	0.199	0.164	0.234		853
Sinaloa	Villa Unión	4.057	2.661	5.758	20.4	614
	Guasave	4.093	3.608	4.581	20.6	599
Chiapas	Tuxtla	3.717	3.300	4.166	18.7	570
	La Palma	4.813	2.576	7.997	24.2	630
Tamaulipas	Reynosa	3.997	3.104	4.951	20.1	421
	Río Bravo	4.827	4.217	5.529	24.3	625
Nuevo León	Monterrey	3.550	2.893	4.478	17.8	542
	Linares	2.288	2.024	2.564	11.5	367
Veracruz	Coatzacoalcos	3.807	2.591	5.104	19.1	437
	Panuco	5.149	4.626	5.653	25.9	505
Yucatán	Mérida	3.381	2.837	3.994	17.0	479
	Umán	1.759	1.444	2.062	8.8*	364
Campeche	Champotón	2.387	1.984	2.784	12.0	436
	Cd. del Carmen	5.609	5.232	6.029	28.2	478

RR: Razón de resistencia

N: Hembras *Ae. aegypti* utilizadas en los ensayos

*Resistencia moderada

Tabla 5. Concentración letal media (CL₅₀) calculada en cada población de *Ae. aegypti* bajo estudio en respuesta a la exposición a bifentrina

ESTADO	POBLACIÓN	CL ₅₀ (µg/botella)	Límite inferior	Límite superior	RR	N
Sinaloa	New Orleans	0.172	0.153	0.191		853
	Guasave	3.270	2.360	4.115	19.01	599
	Villa Unión	3.194	2.460	3.914	18.57	614
Chiapas	Tuxtla	2.887	2.276	3.556	16.78	570
	La Palma	2.945	2.354	3.542	17.12	630
Tamaulipas	Reynosa	2.886	2.080	3.728	16.78	421
	Rio Bravo	4.215	3.719	4.792	24.51	625
Nuevo León	Monterrey	2.857	2.503	3.211	16.61	542
	Linares	1.911	1.694	2.123	11.11	367
Veracruz	Panuco	5.340	4.920	5.759	31.05	437
	Coatzacoalcos	3.486	2.770	4.272	20.27	505
Yucatán	Mérida	3.385	2.050	5.183	19.68	479
	Umán	2.226	2.134	2.980	12.94	364
Campeche	Champotón	2.060	1.650	2.455	11.98	436
	Cd. del Carmen	4.919	4.094	5.890	28.60	478

RR: Razón de resistencia

N: Hembras *Ae. aegypti* utilizadas en los ensayos

7.1.2. Susceptibilidad a deltametrina en poblaciones de *Ae. aegypti* de México

Como en el caso de bifentrina, resultados obtenidos a través de los bioensayos en botella sugieren que todas las poblaciones bajo estudio son resistentes a deltametrina, al obtener valores de razón de resistencia (RR) entre 18.4 – 86.9 para la CK₅₀ y de 26.6 a 160.9 para la CL₅₀ (Tablas 6 y 7). Los valores CL₅₀ superiores se obtuvieron en mosquitos provenientes de Cd. del Carmen, Campeche y Valladolid, Yucatán, los cuales fueron de 1.77 y 1.52 µg/botella, respectivamente.

Tabla 6. Concentración de derribo media (CK₅₀) calculada en cada población de *Ae. aegypti* bajo estudio en respuesta a la exposición a deltametrina

ESTADO	POBLACIÓN	CK ₅₀ (µg/botella)	Límite inferior	Límite superior	RR	N
	New Orleans	0.013	0.01	0.015		651
Sinaloa	Guasave	0.239	0.113	0.442	18.4	790
	Villa Unión	0.285	0.206	0.365	21.9	834
Chiapas	Tuxtla	0.474	0.355	0.606	36.5	710
	La Palma	0.460	0.395	0.526	35.4	902
Tamaulipas	Reynosa	0.448	0.39	0.508	34.5	882
	Rio Bravo	0.578	0.425	0.705	44.5	704
Nuevo León	Monterrey	0.578	0.435	0.719	44.5	486
	Linares	0.35	0.001	1.279	26.9	361
Veracruz	Coatzacoalcos	0.656	0.478	0.799	50.5	316
	Catemaco	0.304	0.175	0.433	23.4	520
Yucatán	Mérida	0.545	0.456	0.621	41.9	471
	Valladolid	1.13	0.84	1.382	86.9	489
Campeche	Champotón	0.512	0.427	0.591	39.4	548
	Cd. del Carmen	0.928	0.525	1.311	71.4	483

RR: Razón de resistencia

N: Hembras *Ae. aegypti* utilizadas en los ensayos

Tabla 7. Concentración letal media (CL₅₀) calculada en cada población de *Ae. aegypti* bajo estudio en respuesta a la exposición a deltametrina

ESTADO	POBLACIÓN	CL ₅₀ (µg/botella)	Límite inferior	Límite superior	RR	N
New Orleans		0.011	0.008	0.014		651
Sinaloa	Guasave	0.293	0.221	0.363	26.6	790
	Villa Unión	0.633	0.545	0.735	57.5	834
Chiapas	Tuxtla	0.855	0.678	1.071	77.7	710
	La Palma	0.649	0.499	0.818	59.0	902
Tamaulipas	Reynosa	0.502	0.453	0.552	45.6	882
	Rio Bravo	0.913	0.695	1.119	83.0	704
Nuevo León	Monterrey	0.669	0.602	0.742	60.8	486
	Linares	0.519	0.456	0.586	47.2	361
Veracruz	Catemaco	0.361	0.192	0.559	32.8	316
	Coatzacoalcos	0.972	0.857	1.097	88.4	520
Yucatán	Mérida	0.651	0.564	0.738	59.2	471
	Valladolid	1.519	1.318	1.753	138.1	489
Campeche	Champotón	0.87	0.747	0.997	79.1	548
	Cd. del Carmen	1.77	1.52	2.097	160.9	483

RR: Razón de resistencia

N: Hembras *Ae. aegypti* utilizadas en los ensayos

7.2. Polimorfismos y sus frecuencias en el vgsc de *Ae. aegypti* con los fenotipos: activos, recuperados y muertos después de la exposición a la CL₅₀ de bifentrina y deltametrina

Utilizando la CL₅₀ como referencia sometimos a las poblaciones a bioensayos y separamos el material en 3 fenotipos: activos, muertos y recuperados. En las Figuras 6 y 7 podemos observar el porcentaje de individuos correspondientes al fenotipo activo (fenotipo resistente), muerto y aquellos que se recuperaron al cabo de 4 horas post exposición a los insecticidas bifentrina y deltametrina. Es importante destacar que en todas las poblaciones bajo estudio se encontraron individuos que se recuperaban del derribo ejercido por el efecto tóxico de los piretroides utilizados, obteniendo porcentajes de recuperación del 5 al 31% ante la exposición a la CL₅₀ de bifentrina y del 1 al 36% al exponerlos a la CL₅₀ de deltametrina.

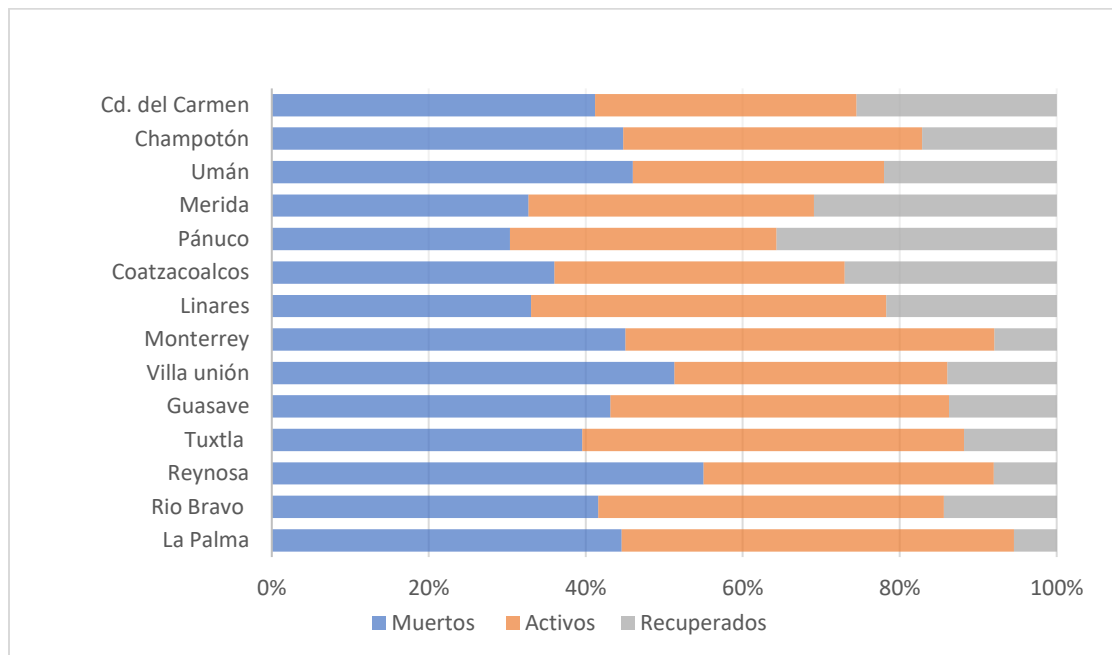


Figura 6. Porcentaje de mosquitos seleccionados por fenotipo después de la exposición a la CL₅₀ calculada con bifentrina en cada población.

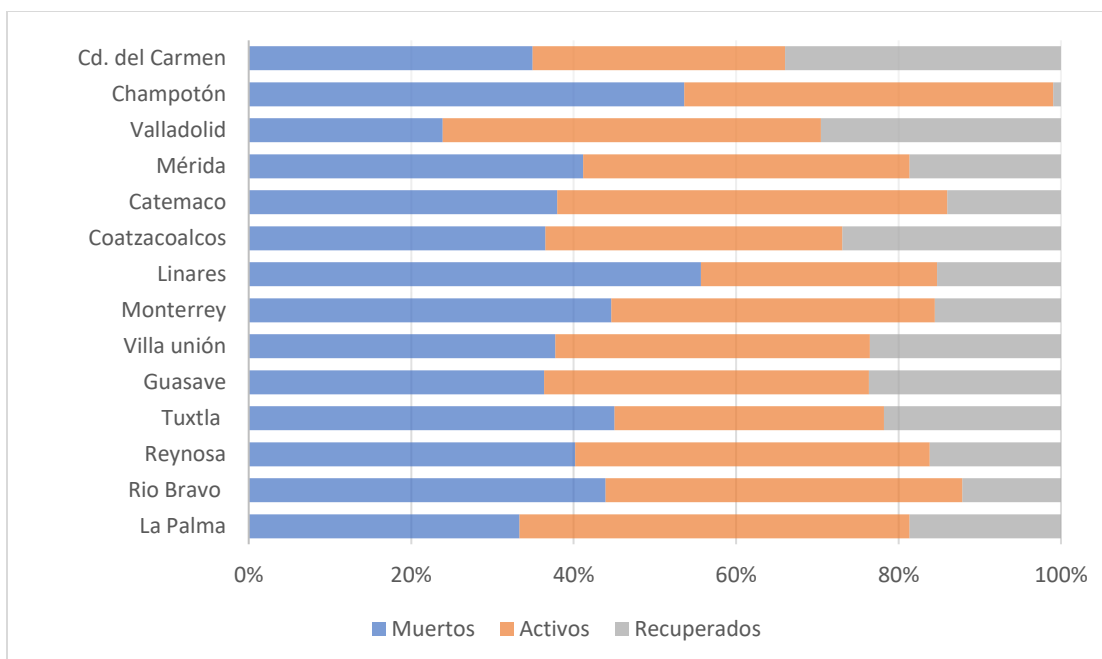


Figura 7. Porcentaje de mosquitos seleccionados por fenotipo después de la exposición a la CL₅₀ calculada con deltametrina en cada población.

Los datos de razón de resistencia y los porcentajes de recuperación obtenidos nos permitieron separar a las poblaciones en seis categorías como de resistencia baja con baja recuperación, resistencia baja con alta recuperación, resistencia moderada con baja recuperación, resistencia moderada con alta recuperación, resistencia alta con baja recuperación y resistencia alta con alta recuperación. Estas categorías se establecieron para cada uno de los piretroides utilizados. Los mosquitos de las poblaciones seleccionadas en cada categoría fueron luego utilizados para la determinación de los polimorfismos asociados con la resistencia kdr.

7.3. Genotipificación de mosquitos seleccionados por fenotipo (activos, recuperados y muertos), después de la exposición a bifentrina

De acuerdo con los resultados de los ensayos moleculares, en todas las poblaciones bajo estudio que fueron expuestas a la CL₅₀ de bifentrina, se encontró que el 100% de los mosquitos muestreados y categorizados de acuerdo con el fenotipo expresado después de

la exposición al insecticida posee el alelo mutado para C1534 con el genotipo homocigoto mutante.

En lo que respecta al locus 1016, se encontró que la frecuencia del genotipo homocigoto I1016 fue superior en mosquitos de fenotipo activo en la mayoría de las poblaciones bajo estudio. Destacándose, las mayores frecuencias entre los mosquitos de las categorías resistencia moderada y alta con alta recuperación. Se encontró que la frecuencia de los heterocigotos fue superior entre mosquitos de poblaciones con baja resistencia a la bifentrina. Mientras que el genotipo homocigoto susceptible se encontró principalmente en mosquitos fenotipados muertos en las poblaciones que de acuerdo con nuestra categoría fueron de resistencia baja (Tabla 8).

En el análisis del locus 410 encontramos un comportamiento similar al del locus antes expuesto, registrándose las frecuencias del genotipo homocigoto mutante superiores entre mosquitos fenotipados como activos, particularmente en las poblaciones de resistencia alta con alta recuperación. Sin embargo, es en estas últimas donde mosquitos fenotipados como muertos mostraron también altas frecuencias del genotipo homocigoto mutante. El genotipo heterocigoto fue más frecuente entre mosquitos de las poblaciones con baja y moderada resistencia. Mientras que el homocigoto susceptible fue superior en mosquitos fenotipados muertos en estas mismas poblaciones (Tabla 8).

El porcentaje de la frecuencia de los alelos mutados en los loci 410 y 1016 vario del 58 al 100% en mosquitos de fenotipo activo, de 35 a 100% en mosquitos fenotipados muertos y del 67 al 100% en mosquitos recuperaos (Tabla 9). Particularmente, en las poblaciones de baja y moderada resistencia a bifentrina, de acuerdo con nuestra categorización, tanto con alta como baja recuperación, la frecuencia de los alelos mutantes L410 e I1016 fueron menores entre mosquitos de fenotipo muerto (Figuras 8 y 9).

Tabla 8. Porcentaje de la frecuencia genotípica de las mutaciones *kdr* en los loci 1534, 1016 y 410 en poblaciones *Ae. aegypti* después de la exposición a bifentrina.

Categoría	Localidad	Fenotipo	<i>F1534C</i>			<i>VI016I</i>			<i>V410L</i>			N
			FF	FC	CC	VV	VI	II	VV	VL	LL	
Resistencia baja /baja recuperación	Champotón, Camp											
		Activos	0	0	100	3.3	43.3	53.3	6.7	70.0	23.3	30
		Muertos	0	0	100	23.3	50.0	26.7	33.3	63.3	3.3	30
		Recuperados	0	0	100	6.7	40.0	53.3	6.7	53.3	40.0	15
Resistencia baja /alta recuperación	Linares, NL											
		Activos	0	0	100	6.7	23.3	70.0	10.0	46.7	43.3	30
		Muertos	0	0	100	43.3	30.0	26.7	43.3	40.0	16.7	30
		Recuperados	0	0	100	4.3	26.1	69.6	4.3	73.9	21.7	23
Resistencia moderada /baja recuperación	Villa Unión, Sin											
		Activos	0	0	100	0	0	100	0.0	33.3	66.7	30
		Muertos	0	0	100	23.3	13.3	63.3	36.7	60	3.3	30
		Recuperados	0	0	100	0.0	21.9	78.1	3.1	46.9	50.0	32
Resistencia moderada /alta recuperación	Mérida, Yuc											
		Activos	0	0	100	0	13.3	86.7	3.3	46.7	50.0	30
		Muertos	0	0	100	16.7	50.0	33.3	26.7	60.0	13.3	30
		Recuperados	0	0	100	2.6	12.8	84.6	12.8	59.0	28.2	39
Resistencia alta /baja recuperación	Panuco, Ver											
		Activos	0	0	100	0	10	90	0	13.3	86.7	30
		Muertos	0	0	100	0	6.7	93.3	0	10.0	90.0	30
		Recuperados	0	0	100	0	5.1	94.9	0	5.1	94.9	39
Resistencia alta /alta recuperación	Ciudad del Carmen, Camp											
		Activos	0	0	100	0	0	100	0	16.7	83.3	30
		Muertos	0	0	100	0	0	100	3.3	0	96.7	30
		Recuperados	0	0	100	0	0	100	0	3.8	96.2	26

FF: Homocigoto susceptible 1534

FC: Heterocigoto 1534

CC: Homocigoto mutado 1534 (resistente)

VV: Homocigoto susceptible 1016

VI: Heterocigoto 1016

II: Homocigoto mutado 1016 (resistente)

VV: Homocigoto susceptible 410

VL: Heterocigoto 410

LL: Homocigoto mutado 410 (resistente)

N: número de hembras *Ae. aegypti* analizadas

Tabla 9. Porcentaje de la frecuencia alélica de las mutaciones *kdr* en los loci 1534, 1016 y 410 en poblaciones *Ae. aegypti* después de la exposición a bifentrina.

Categoría	Localidad	Fenotipo	<i>F1534C</i>		<i>V1016I</i>		<i>V410L</i>	
			F	C	V	I	V	L
Resistencia baja /baja recuperación	Champotón, Camp							
		Activos	0	100	25.0	75.0	41.7	58.3
		Muertos	0	100	48.3	51.7	65.0	35.0
		Recuperados	0	100	26.7	73.3	33.3	66.7
Resistencia baja /alta recuperación	Linares, NL							
		Activos	0	100	18.3	81.7	33.3	66.7
		Muertos	0	100	58.3	41.7	63.3	36.7
		Recuperados	0	100	17.4	82.6	41.3	58.7
Resistencia moderada /baja recuperación	Villa Unión, Sin							
		Activos	0	100	0	100	16.7	83.3
		Muertos	0	100	30.0	70.0	66.7	33.3
		Recuperados	0	100	10.9	89.1	26.6	73.4
Resistencia moderada /alta recuperación	Mérida, Yuc							
		Activos	0	100	6.7	93.3	26.7	73.3
		Muertos	0	100	41.7	58.3	56.7	43.3
		Recuperados	0	100	9.0	91.0	42.3	57.7
Resistencia alta /baja recuperación	Panuco, Ver							
		Activos	0	100	5.0	95.0	6.7	93.3
		Muertos	0	100	3.3	96.7	5.0	95.0
		Recuperados	0	100	2.6	97.4	2.6	97.4
Resistencia alta /alta recuperación	Ciudad del Carmen, Camp							
		Activos	0	100	0.0	100	8.3	91.7
		Muertos	0	100	0.0	100	3.3	96.7
		Recuperados	0	100	0.0	100	1.92	98.1

F: Alelo susceptible 1534

C: Alelo mutado 1534 (resistente)

V: Alelo susceptible 1016

I: Alelo mutado 1016 (resistente)

V: Alelo susceptible 410

L: Alelo mutado 410 (resistente)

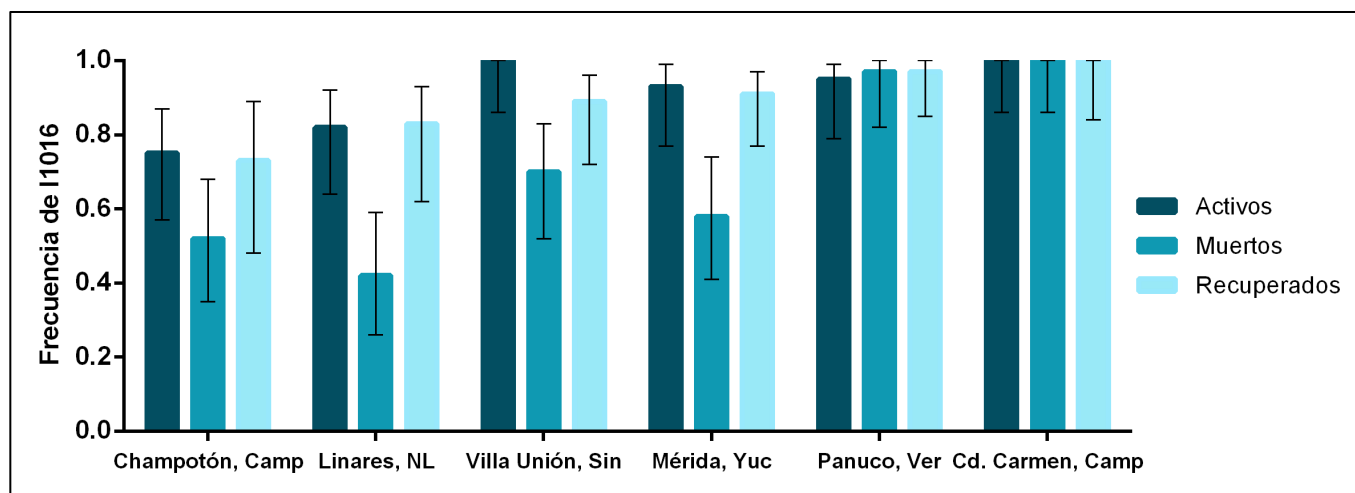


Figura 8. Frecuencia del alelo mutado I1016 en mosquitos seleccionados por fenotipo después de la exposición a la CL₅₀ calculada para cada población con bifentrina.

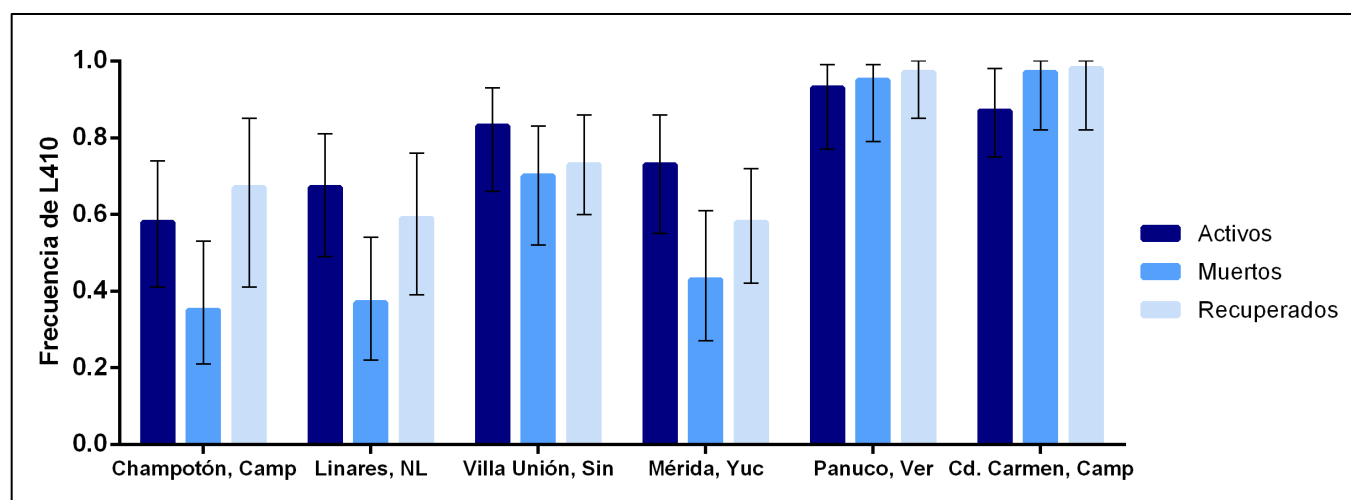


Figura 9. Frecuencia del alelo mutado L410 en mosquitos seleccionados por fenotipo después de la exposición a la CL₅₀ calculada para cada población, con bifentrina.

7.4. Asociación entre la frecuencia de los polimorfismos y los resultados de bioensayos con bifentrina

Al asociar los fenotipos con los genotipos determinados en cada nivel de categoría encontramos que existe una asociación significativa, entre estos en mosquitos de las poblaciones de baja y moderada resistencia con baja y alta recuperación, esto para el locus 410, lo anterior basados en el análisis de tablas de contingencia 3x3 (X^2 , $p \leq 0.05$). Tal asociación en la posición 410 se debe a la alta proporción de heterocigotos sobre todo en

los fenotipos activos y recuperados. Mientras que para la posición 1016 solo se encontró dicha asociación entre los mosquitos de poblaciones con baja resistencia y alta recuperación y moderada resistencia con alta y baja recuperación. En este locus se observa que la asociación esta dada por el elevado número de homocigotos mutantes en los fenotipos activos y recuperados (Tablas 10-12).

Tabla 10. Asociación de los loci 410, 1016 y 1534 con los fenotipos activos, muertos y recuperados, después de la exposición a la CL₅₀ de bifentrina en poblaciones categorizadas como de resistencia baja con baja y alta recuperación.

RESISTENCIA BAJA A LA BIFENTRINA							
		Loci	Genotipo	n = 30	n = 30	n = 15	
				ACTIVOS	MUERTOS	RECUPERADOS	
BAJA RECUPERACIÓN	CHAMPOTON, CAMPECHE	410*	VV	2 (15%)	10 (77%)	1 (8%)	
			VL	21 (44%)	19 (40%)	8 (16%)	
			LL	7 (23.3%)	1 (3.3%)	6 (40%)	
			X²= 15.608 p=0.004				
		1016	VV	1 (11%)	7 (78%)	1 (11%)	
			VI	13 (38%)	15 (44%)	6 (18%)	
			II	16 (50%)	8 (25%)	8 (25%)	
			X²= 8.71 p=0.069				
		1534	FF	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
			FC	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
			CC	30 (40%)	30 (40%)	15 (20%)	
			-				
				Loci	Genotipo	n = 30	n = 30
	ALTA RECUPERACIÓN	LINARES, NUEVO LEÓN	410*	VV	3 (18%)	13 (76%)	1 (6%)
VL				14 (33%)	12 (28%)	17 (39%)	
LL				13 (56%)	5 (22%)	5 (22%)	
			X²= 19.569 p= 0.001				
1016*			VV	2 (13%)	13 (81%)	1 (6%)	
			VI	7 (32%)	9 (41%)	6 (27%)	
			II	21 (46%)	8 (18%)	16 (36%)	
			X²= 20.971 p= 0.000				
1534			FF	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
			FC	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
			CC	30 (36%)	30 (36%)	23 (28%)	
		-					

* Asociación estadísticamente significativa (Tablas de contingencia 3x3, p ≤0.05)

n= Hembras *Ae. aegypti* analizadas

Entre paréntesis se encuentra el porcentaje de mosquitos de cada fenotipo dentro de cada genotipo

Tabla 11. Asociación de los loci 410, 1016 y 1534 con los fenotipos activos, muertos y recuperados, después de la exposición a la CL₅₀ de bifentrina en poblaciones categorizadas como de resistencia moderada con baja y alta recuperación.

RESISTENCIA MODERADA A LA BIFENTRINA							
		Loci	Genotipo	n = 30	n = 30	n = 32	
				ACTIVOS	MUERTOS	RECUPERADOS	
BAJA RECUPERACIÓN	VILLA UNIÓN, SINALOA	410*	VV	0 (0%)	11 (92%)	1 (8%)	
			VL	10 (23%)	18(42%)	15 (35%)	
			LL	20 (54%)	1 (3%)	16 (43%)	
			X²= 37.57 p=0.000				
		1016*	VV	0 (0%)	7 (100%)	0 (0%)	
			VI	0 (0%)	4 (36%)	7 (64%)	
			II	30 (40%)	19 (26%)	25 (34%)	
			X²= 23.274 p=0.000				
		1534	FF	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
			FC	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
			CC	30 (33%)	30 (33%)	32 (34%)	
			-				
				Loci	Genotipo	n = 30	n = 30
ALTA RECUPERACIÓN	MÉRIDA, YUCATÁN	410*	VV	1 (7%)	8 (57%)	5 (36%)	
			VL	14 (25%)	18 (33%)	23 (42%)	
			LL	15 (50%)	4 (13%)	11 (37%)	
			X²= 13.218 p= 0.010				
		1016*	VV	0 (0%)	5 (83%)	1 (17%)	
			VI	4 (17%)	15 (63%)	5 (20%)	
			II	26 (38%)	10 (14%)	33 (48%)	
			X²= 28.131 p= 0.000				
		1534	FF	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
			FC	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
			CC	30 (30%)	30 (30%)	39 (40%)	
			-				

* Asociación estadísticamente significativa (Tablas de contingencia 3x3, X² p ≤0.05)

n= Hembras *Ae. aegypti* analizadas

Entre paréntesis se encuentra el porcentaje de mosquitos de cada fenotipo dentro de cada genotipo

Tabla 12. Asociación de los loci 410, 1016 y 1534 con los fenotipos activos, muertos y recuperados, después de la exposición a la CL₅₀ de bifentrina en poblaciones categorizadas como de resistencia alta con baja y alta recuperación.

RESISTENCIA ALTA A LA BIFENTRINA								
		Loci	Genotipo	n = 30	n = 30	n = 39		
				ACTIVOS	MUERTOS	RECUPERADOS		
BAJA RECUPERACIÓN	PANUCO, VERACRUZ	410	VV	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
			VL	4 (44%)	3 (33%)	2 (23%)		
			LL	26 (29%)	27 (30 %)	37(41%)		
			X²= 1.424 p=0.491					
		1016	VV	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
			VI	3 (42%)	2 (29%)	2 (29%)		
			II	27 (29 %)	29 (31 %)	37(40%)		
			X²= 0.623 p=0.732					
		1534	FF	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
			FC	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
			CC	30 (30%)	30 (30%)	39 (40%)		
			-					
				Loci	Genotipo	n = 30	n = 30	n = 26
		ALTA RECUPERACIÓN	CD. DEL CARMEN, CAMPECHE	410	VV	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
VL	0 (0%)				1 (25%)	3 (75%)		
LL	29 (36%)				29 (36%)	23 (28%)		
	X²= 7.07 p= 0.132							
1016	VV			0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
	VI			0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
	II			30 (35%)	30 (35%)	26(30%)		
	-							
1534	FF			0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
	FC			0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
	CC			30 (35%)	30 (35%)	26 (30%)		
	-							

* Asociación estadísticamente significativa (Tablas de contingencia 3x3, X² p ≤0.05)

n= Hembras *Ae. aegypti* analizadas

Entre paréntesis se encuentra el porcentaje de mosquitos de cada fenotipo dentro de cada genotipo

7.5. Genotipificación de mosquitos seleccionados por fenotipo (activos, recuperados y muertos) después de la exposición a deltametrina

En los análisis hechos a partir de mosquitos expuestos a la CL_{50} de deltametrina nuevamente se observa que el alelo C1534 esta fijo en las poblaciones bajo estudio, encontrando indistintamente homocigotos mutados en todos los fenotipos dentro de todas las localidades (Tabla 13).

Para el locus 1016 vemos que la frecuencia de homocigotos mutantes es superior en poblaciones de alta resistencia a deltametrina con alta recuperación. Pero particularmente esta frecuencia se ve incrementada entre los fenotipos activos con respecto al resto en poblaciones de moderada y alta resistencia con alta y baja recuperación, respectivamente (Tabla 13).

Mientras tanto, en el locus 410 vemos que la frecuencia del homocigoto mutante es superior en el fenotipo activo en todas las poblaciones bajo estudio. Llama la atención que, pese a la baja frecuencia de homocigotos silvestres entre los mosquitos analizados, estos se presentaron con mayor frecuencia entre los fenotipados como muertos en todas las poblaciones, exceptuando la población de Cd. del Carmen, Campeche, la cual fue categorizada como de resistencia alta con alta recuperación y donde el alelo I1016 esta fijo en todos los mosquitos analizados (Tabla 13).

En cuanto a la frecuencia alélica, el alelo I1016 esta presente en más del 50% de los mosquitos fenotipados como activos y recuperados, variando del 64% al 100%. Solo en los mosquitos de Villa Unión, el porcentaje fue menor (31%) entre los recuperados. En lo que respecta al alelo L410, el porcentaje de este fue de 61.7% a 100% entre mosquitos activos y del 29.2% al 92.6% en mosquitos recuperados (Tabla 14). En las Figuras 10 y 11 puede observarse la frecuencia de los alelos mutados I1016 y L410 en cada localidad estudiada de acuerdo con fenotipo determinado después de la exposición a deltametrina.

Tabla 13. Porcentaje de la frecuencia genotípica de las mutaciones *kdr* en los loci 1534, 1016 y 410 en poblaciones de *Ae. aegypti* después de la exposición a deltametrina.

Categoría	Localidad	Fenotipo	1534			1016			410			N
			FF	FC	CC	VV	VI	II	VV	VL	LL	
Resistencia baja /baja recuperación	Catemaco, Ver											
		Activos	0	0	100	0	63.3	36.7	3.3	10	86.7	30
		Muertos	0	0	100	3.7	66.7	29.6	23.3	6.7	70	30
		Recuperados	0	0	100	0	71.4	28.6	14.3	28.6	57.1	14
Resistencia baja /alta recuperación	Guasave, Sin											
		Activos	0	0	100	10	46.7	43.3	10	76.7	23.3	30
		Muertos	0	0	100	20	73.3	6.7	20	60	20	30
		Recuperados	0	0	100	12	42.0	44	16	54	30	50
Resistencia moderada /baja recuperación	Monterrey, NL											
		Activos	0	0	100	6.7	30	63.3	10	30	60	30
		Muertos	0	0	100	13.3	63.3	23.3	23.3	56.7	20	30
		Recuperados	0	0	100	0	43.3	56.7	0	46.7	53.3	30
Resistencia moderada /alta recuperación	Villa Unión, Sin											
		Activos	0	0	100	13.3	46.7	40	13.3	46.7	40	30
		Muertos	0	0	100	73.3	23.3	3.3	73.3	23.3	3.3	30
		Recuperados	0	0	100	43.8	50	6.3	43.8	54.2	2.1	48
Resistencia alta /baja recuperación	Rio Bravo, Tam											
		Activos	0	0	100	3.3	40	56.7	0	13.3	86.7	30
		Muertos	0	0	100	20	40	40	26.7	43.3	30	30
		Recuperados	0	0	100	3.8	11.5	84.6	7.7	30.8	61.5	26
Resistencia alta /alta recuperación	Ciudad del Carmen, Camp											
		Activos	0	0	100	0	0	100	0	6.7	93.3	30
		Muertos	0	0	100	0	0	100	0	23.3	76.7	30
		Recuperados	0	0	100	0	0	100	0	14.7	85.3	34

FF: Homocigoto susceptible 1534

FC: Heterocigoto 1534

CC: Homocigoto mutado 1534 (resistente)

VV: Homocigoto susceptible 1016

VI: Heterocigoto 1016

II: Homocigoto mutado 1016 (resistente)

VV: Homocigoto susceptible 410

VL: Heterocigoto 410

LL: Homocigoto mutado 410 (resistente)

N: número de hembras *Ae. aegypti* analizadas

Tabla 14. Porcentaje de la frecuencia alélica de las mutaciones *kdr* en los loci 1534, 1016 y 410 en poblaciones de *Ae. aegypti* después de la exposición a deltametrina.

Categoría	Localidad	Fenotipo	F1534C		V1016I		V410L	
			F	C	V	I	V	L
Resistencia baja /baja recuperación	Catemaco, Ver							
		Activos	0	100	32	68	8	92
		Muertos	0	100	37	63	27	73
		Recuperados	0	100	36	64	29	71
Resistencia baja /alta recuperación	Guasave, Sin							
		Activos	0	100	33.3	66.7	48.3	61.7
		Muertos	0	100	56.7	43.3	50.0	50
		Recuperados	0	100	33.0	65.0	43.0	57
Resistencia moderada /baja recuperación	Monterrey, NL							
		Activos	0	100	21.7	78.3	25.0	75
		Muertos	0	100	45	55.0	50.0	46.7
		Recuperados	0	100	21.7	78.3	23.3	76.7
Resistencia moderada /alta recuperación	Villa Unión, Sin							
		Activos	0	100	36.7	63.3	36.7	63.3
		Muertos	0	100	85.0	15	85	15
		Recuperados	0	100	68.8	31.3	70.8	29.2
Resistencia alta /baja recuperación	Rio Bravo, Tam							
		Activos	0	100	25	71.7	5	95
		Muertos	0	100	40	60	0	0
		Recuperados	0	100	7.7	88.5	34.6	65.4
Resistencia alta /alta recuperación	Ciudad del Carmen, Camp							
		Activos	0	100	0	100	3.3	96.7
		Muertos	0	100	0	100	11.7	88.3
		Recuperados	0	100	0	100	7.4	92.6

F: Alelo susceptible 1534

C: Alelo mutado 1534 (resistente)

V: Alelo susceptible 1016

I: Alelo mutado 1016 (resistente)

V: Alelo susceptible 410

L: Alelo mutado 410 (resistente)

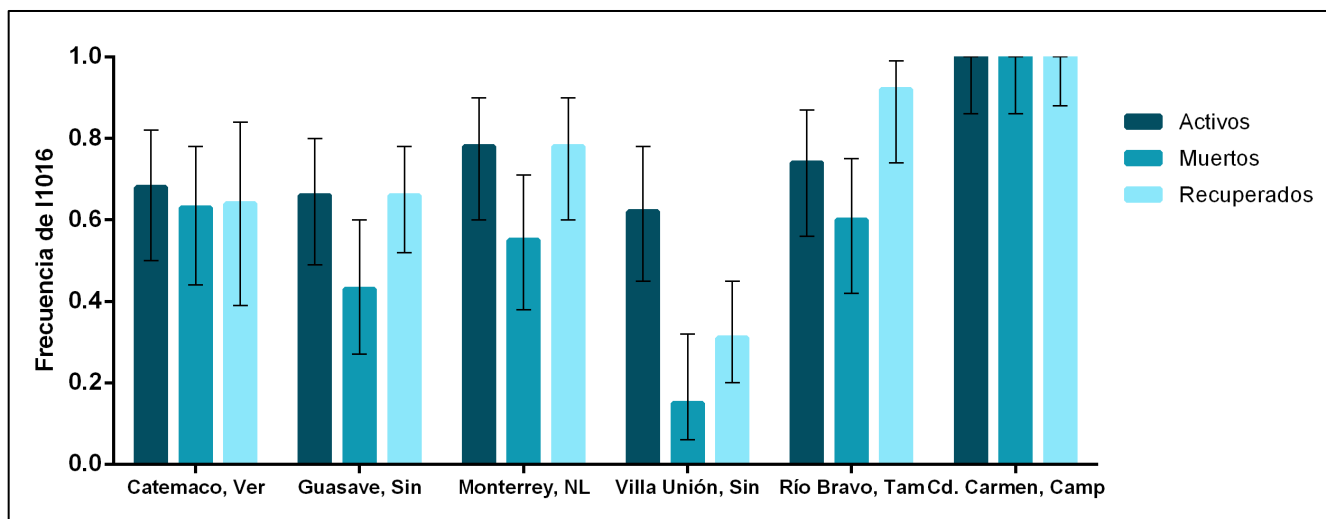


Figura 10. Frecuencia del alelo mutado I1016 en mosquitos seleccionados por fenotipo después de la exposición a la CL50 calculada para cada población, con deltametrina.

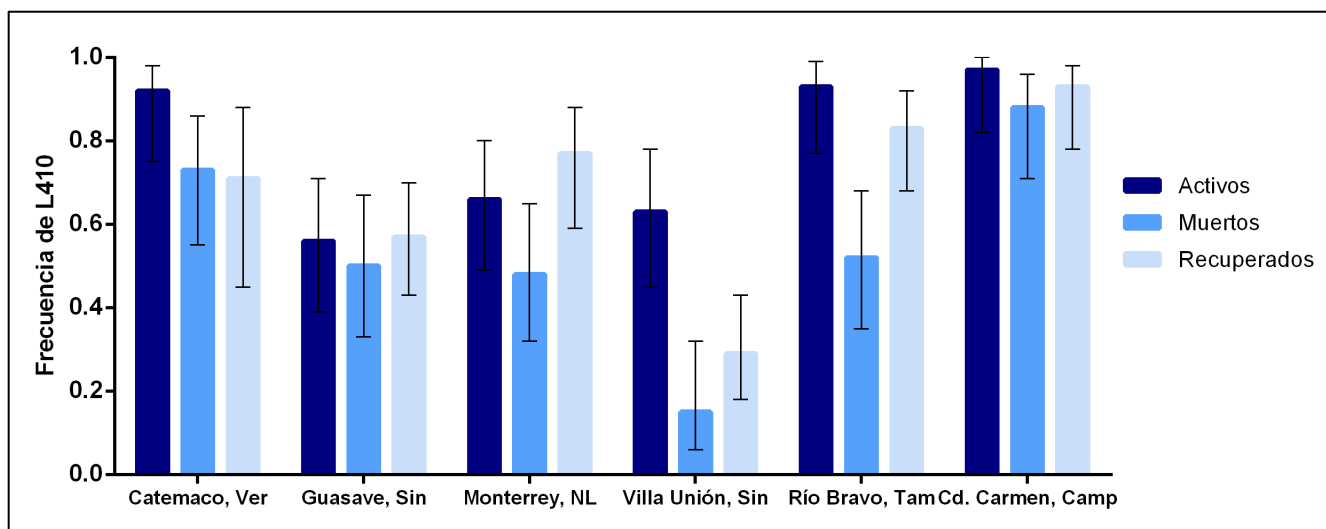


Figura 11. Frecuencia del alelo mutado L410 en mosquitos seleccionados por fenotipo después de la exposición a la CL50 calculada para cada población, con deltametrina.

7.6. Asociación entre la frecuencia de los polimorfismos y los resultados de bioensayos con deltametrina

Las tablas 15 a 17 muestran los resultados del análisis de tablas de contingencia 3x3 y la asociación basada entre los valores observados y esperados de los genotipos en cada fenotipo por cada locus de mosquitos expuestos a deltametrina. Encontramos una asociación significativa para el locus 410 entre los fenotipos y genotipos de mosquitos provenientes de las poblaciones con resistencia baja y baja recuperación, resistencia moderada con baja y alta recuperación y resistencia alta con baja recuperación. Mientras que con el locus 1016, la asociación se encontró entre mosquitos de las poblaciones con baja resistencia y alta recuperación, resistencia moderada con alta y baja recuperación y resistencia alta con baja recuperación. A diferencia de lo encontrado en los mosquitos expuestos a bifentrina, para deltametrina las asociaciones encontradas obedecen a la alta proporción de heterocigotos y homocigotos mutantes entre los fenotipos activos y recuperados, así como, a la alta proporción de homocigotos susceptibles entre los mosquitos fenotipados como muertos. Cabe mencionar que en estos últimos también se determinaron proporciones importantes de heterocigotos.

Tabla 15. Asociación de los loci 410, 1016 y 1534 con los fenotipos activos, muertos y recuperados, después de la exposición a la CL₅₀ de deltametrina en poblaciones categorizadas como de resistencia baja con baja y alta recuperación (Tablas de contingencia 3x3).

RESISTENCIA BAJA A LA DELTAMETRINA					
	Loci	Genotipo	n = 30	n = 30	n = 14
			ACTIVOS	MUERTOS	RECUPERADOS
BAJA RECUPERACIÓN	CATEMACO, VERACRUZ	410*	VV	1 (10%)	7 (70%)
			VL	3 (33%)	2 (22%)
			LL	26 (47%)	21 (38%)
		X ² = 9.654 p=0.047			
		1016	VV	0 (0%)	1 (100%)
			VI	19 (40%)	19 (40%)
			II	11 (44%)	10 (40%)
		X ² = 1.770 p=0.778			
		1534	FF	0 (0%)	0 (0%)
			FC	0 (0%)	0 (0%)
			CC	30 (41%)	30 (41%)
		-			
ALTA RECUPERACIÓN	GUASAVE, SINALOA	Loci	Genotipo	n = 30	n = 30
		410	VV	3 (18 %)	6 (35%)
			VL	20 (31 %)	18 (28 %)
			LL	7 (25 %)	6 (21%)
		X ² = 2.312 p= 0.678			
		1016*	VV	3 (20%)	6 (40%)
			VI	14 (25%)	22 (39%)
			II	13 (34%)	2 (5 %)
		X ² = 14.363 p= 0.006			
		1534	FF	0 (0%)	0 (0%)
			FC	0 (0%)	0 (0%)
			CC	30 (27%)	30 (27%)
		-			

* Asociación estadísticamente significativa (Tablas de contingencia 3x3, X² p ≤0.05)

n= Hembras *Ae. aegypti* analizadas

Entre paréntesis se encuentra el porcentaje de mosquitos de cada fenotipo dentro de cada genotipo

Tabla 16. Asociación de los loci 410, 1016 y 1534 con los fenotipos activos, muertos y recuperados, después de la exposición a la CL₅₀ de deltametrina en poblaciones categorizadas como de resistencia moderada con baja y alta recuperación (Tablas de contingencia 3x3).

RESISTENCIA MODERADA A LA DELTAMETRINA								
		Loci	Genotipo	n = 30	n = 30	n = 30		
				ACTIVOS	MUERTOS	RECUPERADOS		
BAJA RECUPERACIÓN	MONTERREY, NUEVO LEÓN	410*	VV	7 (50%)	7 (50%)	0 (0%)		
			VL	9 (23%)	17 (43%)	14 (35%)		
			LL	18 (45%)	6 (15%)	16 (40%)		
			x2= 16.050 p=0.003					
		1016*	VV	2 (33%)	4 (67%)	0 (0%)		
			VI	9 (22%)	19 (46%)	13 (32%)		
			II	19 (44%)	7 (16%)	17 (40%)		
			x2= 13.475 p=0.009					
		1534	FF	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
			FC	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
			CC	30 (33%)	30 (33%)	30 (33%)		
			-					
				Loci	Genotipo	n = 30	n = 30	n = 48
		ALTA RECUPERACIÓN	VILLA UNIÓN, SINALOA	410*	VV	4 (8%)	22 (46%)	22 (46%)
VL	14 (30%)				7 (15%)	25 (54%)		
LL	12 (86%)				1 (7%)	1 (7%)		
	x2= 39.37 p= 0.000							
1016*	VV			4 (8%)	22 (47%)	21 (45%)		
	VI			14 (31%)	7 (16%)	24 (53%)		
	II			12 (75%)	1 (6%)	3 (19%)		
	x2= 33.7 p= 0.000							
1534	FF			0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
	FC			0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
	CC			30 (28%)	30 (28%)	48 (44%)		
	-							

* Asociación estadísticamente significativa (Tablas de contingencia 3x3, X² p ≤0.05)

n= Hembras *Ae. aegypti* analizadas

Entre paréntesis se encuentra el porcentaje de mosquitos de cada fenotipo dentro de cada genotipo

Tabla 17. Asociación de los loci 410, 1016 y 1534 con los fenotipos activos, muertos y recuperados, después de la exposición a la CL₅₀ de deltametrina en poblaciones categorizadas como de resistencia alta con baja y alta recuperación (Tablas de contingencia 3x3).

RESISTENCIA ALTA A LA DELTAMETRINA								
		Loci	Genotipo	n = 30	n = 30	n = 26		
				ACTIVOS	MUERTOS	RECUPERADOS		
BAJA RECUPERACIÓN	RÍO BRAVO, TAMAULIPAS	410*	VV	0 (0%)	8 (80%)	2 (20%)		
			VL	4 (16%)	13 (52%)	8 (32%)		
			LL	26 (51%)	9 (18%)	16 (31%)		
			x2= 22.504 p=0.000					
		1016*	VV	1 (13%)	6 (74%)	1 (13%)		
			VI	12 (44%)	12 (44%)	3 (12%)		
			II	17 (33%)	12 (24%)	22 (43%)		
			x2= 15.081 p=0.005					
		1534	FF	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
			FC	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
			CC	30 (35%)	30 (35%)	26 (30%)		
			-					
				Loci	Genotipo	n = 30	n = 30	n = 34
		ALTA RECUPERACIÓN	CD. DEL CARMEN, CAMPECHE	410	VV	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
VL	2 (13%)				8 (54%)	5 (33%)		
LL	28 (35%)				22 (28%)	29 (37%)		
	x2= 4.283 p= 0.117							
1016	VV			0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
	VI			0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
	II			30 (32%)	30 (32%)	34 (36%)		
	-							
1534	FF			0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
	FC			0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
	CC			30 (32%)	30 (32%)	34 (36%)		
	-							

* Asociación estadísticamente significativa (Tablas de contingencia 3x3, X² p ≤0.05)

n= Hembras *Ae. aegypti* analizadas

Entre paréntesis se encuentra el porcentaje de mosquitos de cada fenotipo dentro de cada genotipo

7.7. Coocurrencia de las mutaciones kdr F1534C, V1016I y V410L en mosquitos expuestos a bifentrina

Se encontraron 7 combinaciones tri-locus de las 27 combinaciones posibles, en la tabla 18 se muestran los porcentajes de individuos por fenotipo de cada combinación genotípica presente en las 6 poblaciones bajo estudio.

Se destaca el bajo porcentaje de individuos con la combinación homocigota mutante para el alelo C1534 (resistente), y los homocigotos susceptibles para los alelos V1016 y V410 (CC/VV/VV), encontrándose solo en 4 de las 6 poblaciones bajo estudio coincidiendo con aquellas categorizadas como de baja y moderada resistencia. Destacándose que la mayor proporción de individuos con esta combinación genotípica asociada a un nivel de susceptibilidad mayor se encontró principalmente entre los individuos de fenotipo muerto.

La coocurrencia de las mutaciones kdr en su genotipo triple homocigoto mutado se encuentra en mayor proporción en los individuos de fenotipo activo en 4 de las 6 poblaciones bajo estudio (Figura 12). Se encontró que la proporción de combinaciones genotípicas asociadas a la resistencia son más altas en las poblaciones de alta resistencia, pero conforme este nivel de resistencia decrece, de acuerdo a nuestra categorización las combinaciones genotípicas trilocus se incrementan, encontrando aquellas asociadas con genotipos susceptibles. Dichos resultados confirman nuestro criterio de selección de las poblaciones.

La segunda combinación genotípica más frecuencia entre las poblaciones fue homocigoto mutado para C1534 e I1016 y heterocigoto V410/L410, la cual fue superior entre las poblaciones de resistencia moderada.

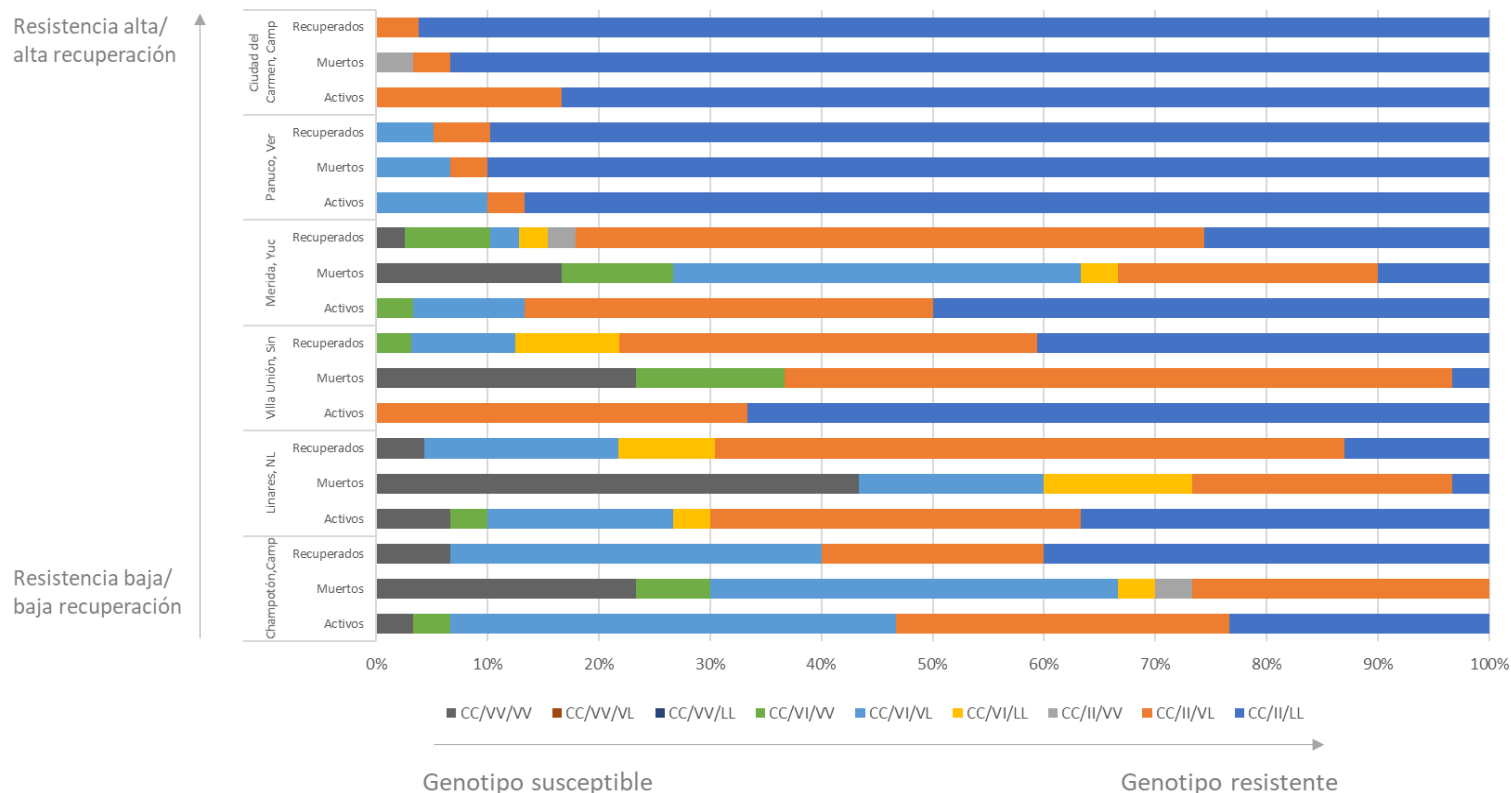


Figura 12. Coocurrencia de las mutaciones kdr en sus diferentes combinaciones tri locus presentes en las poblaciones de *Ae. aegypti* bajo estudio expuestas a bifentrina

CC/II/LL C1534 homocigoto mutado/ I1016 homocigoto mutado / L410 homocigoto mutado
 CC/II/VL C1534 homocigoto mutado / I1016 homocigoto mutado / V410L heterocigoto
 CC/II/VV C1534 homocigoto mutado / I1016 homocigoto mutado /V410 homocigoto susceptible
 CC/VI/LL C1534 homocigoto mutado / V1016L heterocigoto/ L410 homocigoto mutado
 CC/VI/VL C1534 homocigoto mutado / V1016L heterocigoto/ V410L heterocigoto
 CC/VI/VV C1534 homocigoto mutado / V1016L heterocigoto/ V410 homocigoto susceptible
 CC/VV/VV: C1534 homocigoto mutado / V1016 homocigoto susceptible / V410 homocigoto susceptible

7.8. Coocurrencia de las mutaciones kdr F1534C, V1016I y V410L en mosquitos expuestos a deltametrina.

Del análisis de coocurrencia en mosquitos expuestos a deltametrina se encontró que la combinación triple homocigoto mutado (genotipo resistente) fue superior en mosquitos de fenotipo vivos y recuperados en todas las poblaciones bajo estudio. Cabe mencionar, que de este grupo de mosquitos se encontraron 9 de las 27 combinaciones genotípicas tri-locus posibles (Figura 13).

Las poblaciones con las combinaciones genotípicas asociadas a la resistencia coinciden con las que basados en nuestros resultados de bioensayos categorizamos como de alta resistencia. Mientras que la población con la mayor combinación genotípica asociada a la susceptibilidad fue Villa Unión, lo que coincide con los resultados expresados por los mosquitos de esta localidad en los bioensayos.

A diferencia de lo encontrado entre los mosquitos expuestos a bifentrina, con deltametrina la combinación genotípica más común después del homocigoto triple mutado fue la combinación homocigota C1534 y heterocigoto V1016/I1016 y V410/L410. Dicha combinación se encontró en 5 de las 6 poblaciones bajo estudio, principalmente entre los mosquitos de fenotipo recuperado, seguido por el fenotipo muerto.

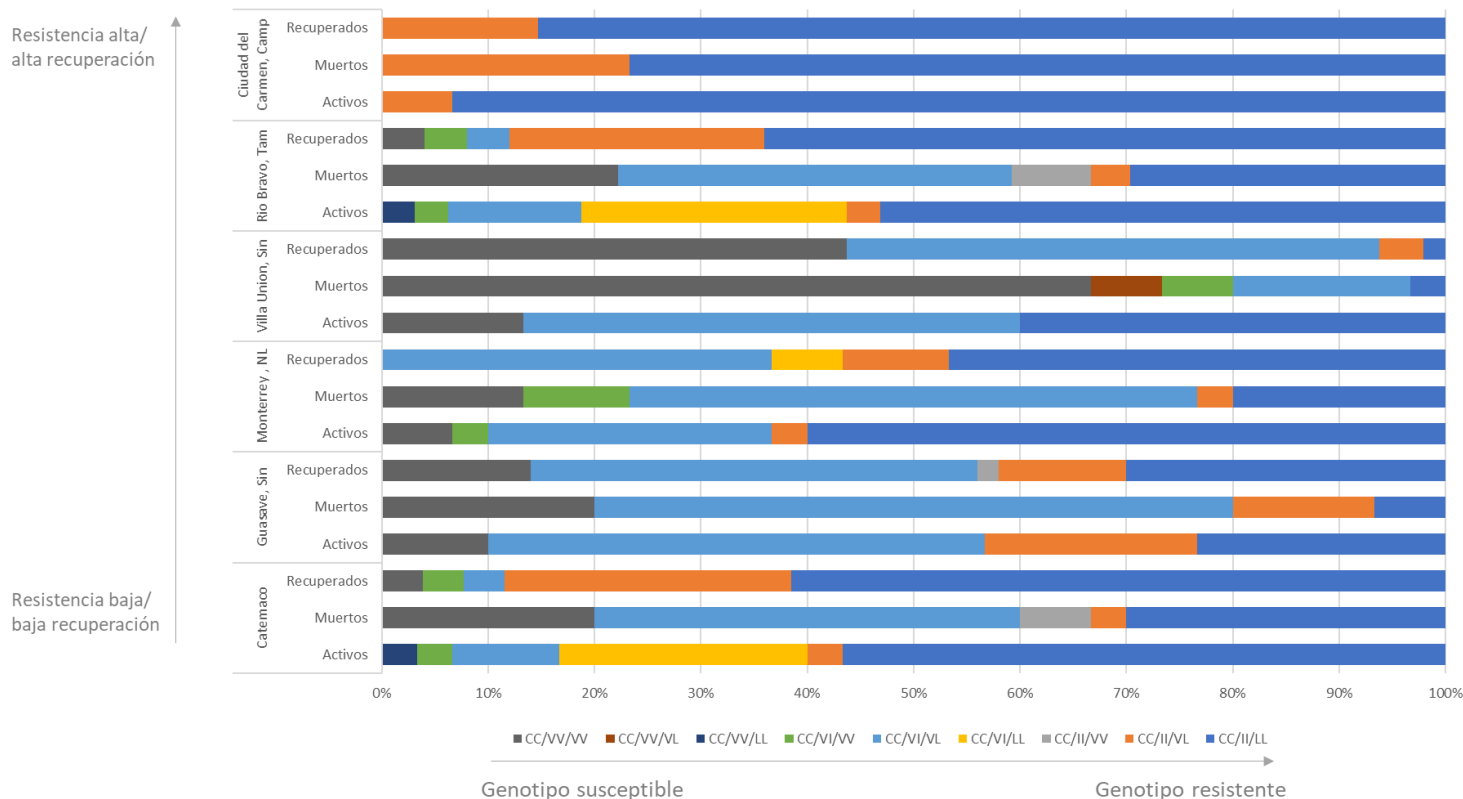


Figura 13. Coocurrencia de las mutaciones kdr en sus diferentes combinaciones tri locus presentes en las poblaciones de *Ae. aegypti* bajo estudio expuestas a deltametrina

CC/II/LL C1534 homocigoto mutado / I1016 homocigoto mutado / L410 homocigoto mutado
 CC/II/VL C1534 homocigoto mutado / I1016 homocigoto mutado / V410L heterocigoto
 CC/II/VV C1534 homocigoto mutado / I1016 homocigoto mutado / V410 homocigoto susceptible
 CC/VI/LL C1534 homocigoto mutado / V1016L heterocigoto/ L410 homocigoto mutado
 CC/VI/VL C1534 homocigoto mutado / V1016L heterocigoto/ V410L heterocigoto
 CC/VI/VV C1534 homocigoto mutado / V1016L heterocigoto/ V410 homocigoto susceptible
 CC/VV/LL C1534 homocigoto mutado / V1016 homocigoto susceptible / L410 homocigoto mutado
 CC/VV/VL C1534 homocigoto mutado / V1016 homocigoto susceptible / V410L heterocigoto
 CC/VV/VV C1534 homocigoto mutado / V1016 homocigoto susceptible / V410 homocigoto susceptible

7.9. Relación entre la frecuencia de los polimorfismos kdr y la resistencia a bifentrina y deltametrina en *Aedes aegypti* de México

En la Figura 14 se muestra la gráfica de correlación de la frecuencia de la condición tri-loci mutante con respecto a la RR obtenida en bioensayos con bifentrina, del análisis se obtuvieron coeficientes de determinación por encima del 90% con una significancia menor a 0.01.

En los gráficos de la Figura 15 se muestra la relación entre las RR obtenidas a partir de la CK_{50} (A, B y C) y CL_{50} (D, E y F) con respecto a la frecuencia genotípica homocigota mutada en el locus 1016 y la frecuencia del alelo mutante entre mosquitos fenotípicamente resistentes. En este caso, los coeficientes de determinación están por encima del 80% con una significancia menor a 0.05 lo que indica una alta relación entre el genotipo y la RR dentro del fenotipo encontrado activo o resistente. En el caso de la frecuencia genotípica heterocigota en el locus 1016 (C y F), se encontró una relación inversa. Mientras más alta RR menos individuos heterocigotos entre los fenotipos activos.

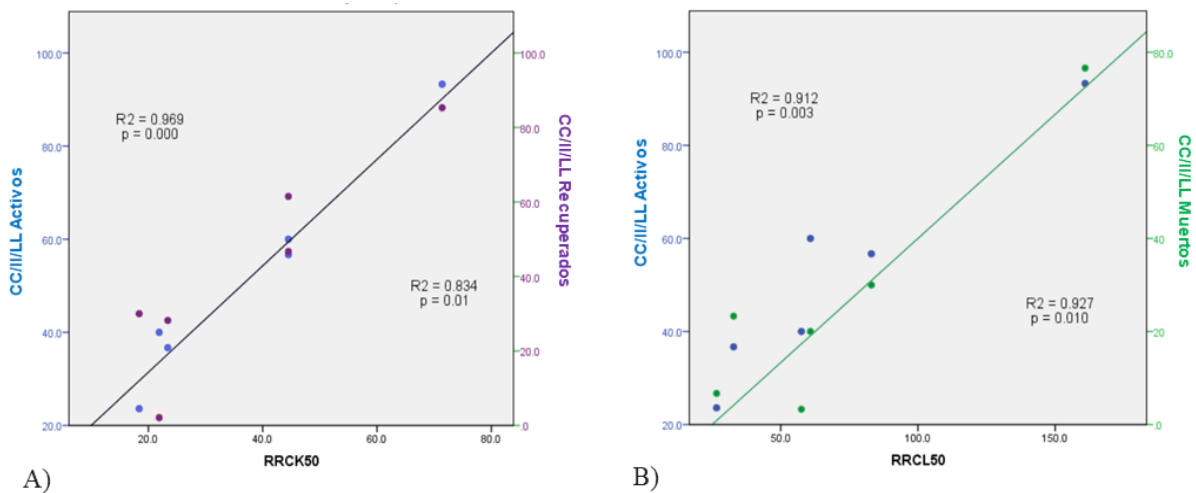


Figura 14. Relación entre A) RRCK50 y tri-loci mutado CC/II/LL en activos (azul) y recuperados (morado); B) RRCL50 y tri-loci mutado CC/II/LL en activos (azul) y muertos (verde), en poblaciones expuestas a bifentrina.

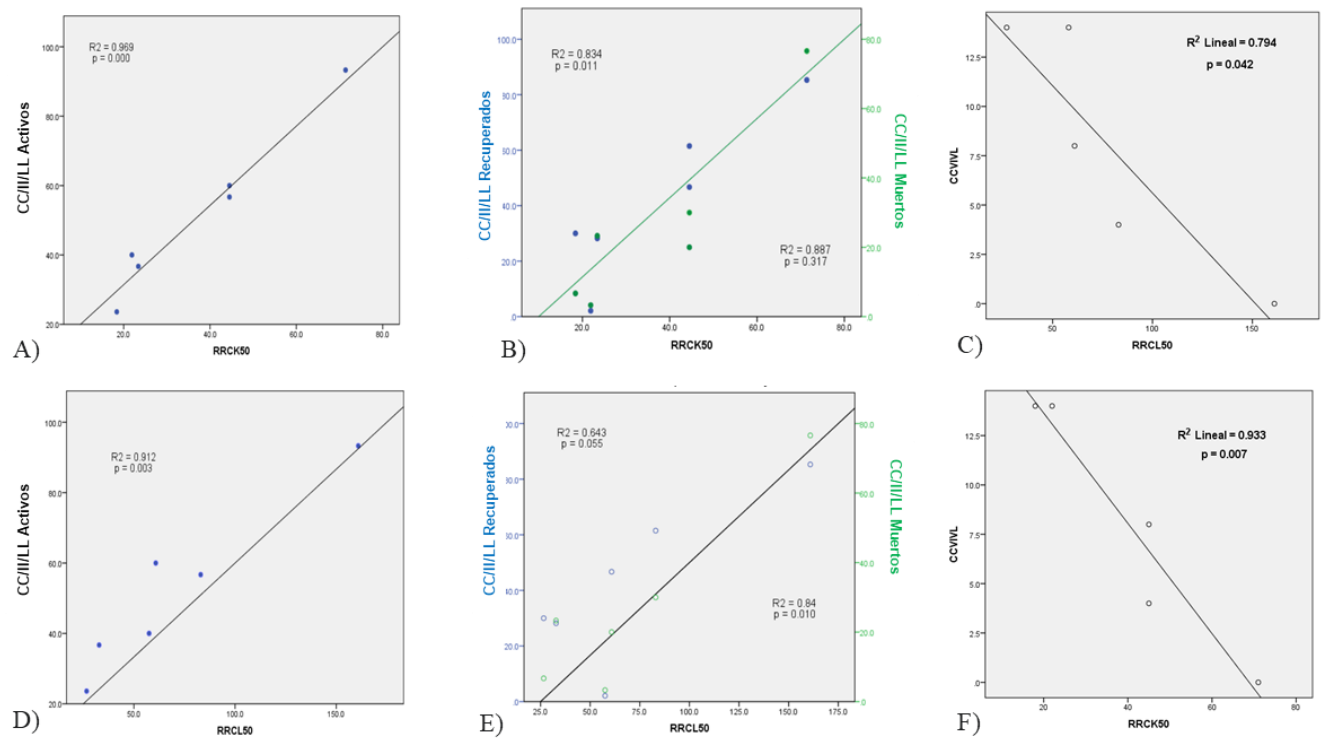


Figura 15. Relación entre A) RRCK50 y alelo mutado I1016; B) RRCK50 y genotipo mutado II1016; C) RRCK50 y genotipo heterocigoto VI1016; D) RRCL50 y alelo mutado I1016; E) RRCL50 y genotipo mutado II1016; F) RRCL50 y genotipo heterocigoto VI1016; en poblaciones expuestas a deltametrina.

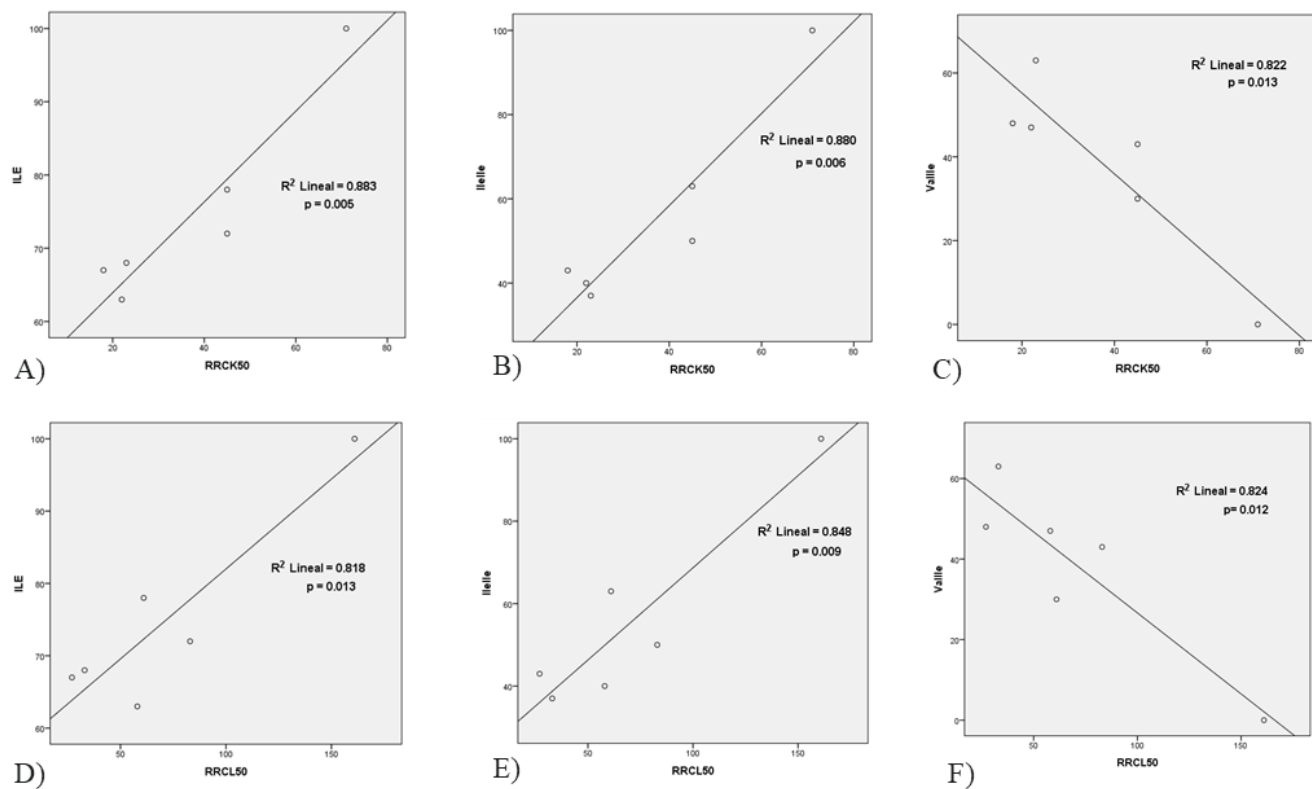


Figura 16. Relación entre A) RRCK50 y tri-loci mutado CC/II/LL en activos; B) RRCK50 y tri-loci mutado CC/II/LL en Recuperados (azul) y muertos (verde); C) RRCK50 y genotipo CC/VI/VL en activos; D) RRCL50 y tri-loci mutado CC/II/LL en activos; E) RRCL50 y tri-loci mutado CC/II/LL en Recuperados (azul) y muertos (verde); F) RRCL50 y genotipo CC/VI/VL en activos; en poblaciones expuestas a deltametrina.

En los gráficos de la Figura 16 se representa la relación entre la RR obtenida de la CK₅₀ (A, B y C) y CL₅₀ (D, E y F) con respecto a la condición genotípica tri-loci mutante de los individuos de los fenotipos activos, recuperados y muertos. Encontramos una relación significativa en los activos con respecto a la RRCK₅₀ y RRCL₅₀ con coeficientes de determinación por encima del 90% con una significancia menor a 0.005. En el caso de los recuperados solo se encontró una relación significativa con respecto a la RRCK₅₀ (Figura 16- B) y en los muertos solo con RRCL₅₀ (Figura 16- E).

En las gráficas 16- C y F se muestra la relación de la RR con respecto a la combinación del genotipo mutante 1534 y el genotipo heterocigoto en 1016 y 410. Se puede apreciar una relación inversa, a mayor RR menor cantidad de individuos con esta condición.

8. DISCUSIÓN

En México, el control de *Ae. aegypti* se realiza en apego a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2014 para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores. Particularmente para este vector establece como algunas de las medidas de manejo, el control físico mediante la remoción de criaderos larvarios; y el control químico mediante el uso de insecticidas, incluyendo organofosforados y piretroides. Son estos últimos los que ampliamente han sido utilizados en los programas operativos de control del vector desde 1999, con el propósito de reducir la transmisión de arbovirus (DOF 2015). Sin embargo, estas medidas han provocado una presión de selección continúa dando como resultado un incremento en el desarrollo de la resistencia a los insecticidas piretroides en las poblaciones de campo del vector (López et al. 2018; Contreras et al. 2020).

La evolución de la resistencia a insecticidas en *Ae. aegypti* puede comprometer la eficacia de los programas de control. Esta resistencia puede ocurrir a través de diferentes mecanismos, siendo los más estudiados a la fecha la sobreexpresión de enzimas de desintoxicación y la insensibilidad en el sitio blanco (Ponce et al. 2009). La insensibilidad del sitio blanco es un mecanismo clave de resistencia a los piretroides en las poblaciones de mosquitos en todo el mundo; este es provocado por mutaciones puntuales no sinónimas en el gen para de la proteína del canal de sodio dependiente de voltaje (vgsc); como consecuencia los mosquitos no pierden la actividad coordinada inmediatamente después de la exposición a piretroides (Plernsub et al. 2016; Haddi et al. 2017).

La resistencia desarrollada contra los piretroides, conocida como resistencia al derribo (kdr), se informó por primera vez en mosca doméstica, *Musca domestica*, en la década de 1950. Actualmente, se ha encontrado que las mismas sustituciones aminoacídicas, así como otras sustituciones de aminoácidos, están asociadas con la resistencia en muchas plagas de insectos de importancia médica y agrícola (Itokawa et al. 2019). Hasta el momento, se han reportado en el mundo, trece mutaciones en el gen para del canal de sodio asociadas con la

resistencia a piretroides en *Ae. aegypti*. Tres de estas mutaciones coocurren en poblaciones mexicanas del vector (Chen et al. 2020; Saavedra et al. 2019).

En este estudio, evaluamos la susceptibilidad a los insecticidas bifentrina (piretroide tipo I) y deltametrina (piretroide tipo II) en una variedad de poblaciones de *Ae. aegypti* de México buscando asociar la respuesta a dicha exposición con los polimorfismos encontrados en el gen que codifica para vgsc.

De acuerdo con nuestros resultados todas las poblaciones bajo estudio son resistentes a ambos piretroides, obteniendo RR que variaron de 11.11 a 31 para la CL₅₀ de bifentrina y de 26.6 a 160.9 para la CL₅₀ de deltametrina. Estos resultados son coincidentes con los de otros autores quienes han determinado también el alto grado de resistencia a piretroides en las poblaciones de *Ae. aegypti* mexicanas. Tal es el caso de Flores y colaboradores (2013), quienes al evaluar diversos insecticidas piretroides determinaron que algunas de las poblaciones de *Ae. aegypti* bajo estudio y provenientes del estado de Veracruz, México son resistentes a piretroides en diferentes grados, encontrando RRCL₅₀ que variaron de 0.6 a 35. Kuri-Morales et al. (2018) estimaron la susceptibilidad en poblaciones mexicanas de mosquitos provenientes de 32 estados, realizando pruebas de susceptibilidad por bioensayo en botella a seis piretroides, dos carbamatos y dos organofosforados. Los niveles más altos de resistencia fueron vistos en los ensayos con los piretroides bifentrina y δ -fenotrina. López y colaboradores (2018) en bioensayos realizados con diferentes piretroides, incluido bifentrina y utilizando la dosis diagnóstico en ensayos de botella, encontraron alta intensidad de resistencia a este con porcentajes de mortalidad $\geq 90\%$ solo hasta 10 veces la dosis diagnóstico (10 μ g/botella). Lo anterior de poblaciones de Nuevo León, Veracruz y Yucatán. Contreras y colaboradores (2020) recientemente reportan CL₅₀ de 0.25 a 5.3 μ g/botella en poblaciones de Yucatán y de 0.80 a 1.2 μ g/botella en poblaciones de Veracruz, bajo la exposición del insecticida deltametrina, indicando de acuerdo con sus resultados, resistencia en las poblaciones estudiadas. Esto refleja cómo se ha mantenido la resistencia a bifentrina y deltametrina a través de los años en las poblaciones mexicanas del vector *Ae. aegypti*, lo que puede deberse al uso continuado de ambos piretroides en los programas de control de este vector. Esto podemos constatarlo en las listas de productos

recomendados del CENAPRECE que, de acuerdo con nuestra normativa, esta instancia publica para su uso en el combate de los insectos vectores y que desde el 2012 incluye dentro de sus listados tanto a la bifentrina como a la deltametrina. En el último listado publicado en junio de 2021, ambos insecticidas son recomendados para su uso en tratamientos espaciales, rociado en vivienda, tratamiento en interiores y tratamiento espacial en interiores con equipo térmico.

Con los valores de CL_{50} obtenidos en cada población bajo estudio, separamos el material exponiendo mosquitos hembra a estas concentraciones y separándolas de acuerdo con el fenotipo expresado. Los fenotipos fueron activos, aquellos mosquitos que después de una hora de exposición permanecían en pie o volando de manera coordinada; muertos para aquellos que no mostraban señales de vida, inmóviles, que no podían levantarse o que sus vuelos fueran descoordinados, además de un tercer fenotipo el cual consistió en mosquitos que después de 4 horas de observación se reincorporaron mostrando señales de recuperación. De nuestros ensayos en los que se expusieron de 100 a 200 mosquitos por población e insecticida evaluado, encontramos que las proporciones entre vivos y muertos no variaban significativamente dentro de cada población, sin embargo, los porcentajes de recuperación variaron de 5% a 31% en los ensayos con bifentrina y de 1% al 34% con deltametrina, lo que refleja la participación de distintos mecanismos de resistencia entre las poblaciones bajo estudio, aunque cabe destacar que en el presente trabajo solo se estudiaron los polimorfismos en el gen *vgsc* como mecanismo de resistencia a piretroides. Tanto los resultados de RR obtenidos para cada insecticida como los porcentajes de recuperación nos permitieron seleccionar las poblaciones categorizándolas como de baja moderada y alta resistencia, distinguiendo a su vez en cada caso si se presentó baja o alta recuperación. Con esta clasificación, determinamos 6 poblaciones que en adelante serían aquellas que estudiaríamos para la búsqueda de las mutaciones *kdr*.

Se identificaron tres polimorfismos en los locus 410, 1016 y 1534 en el gen *para* de las poblaciones de *Ae. aegypti* bajo estudio. Esto confirma lo reportado para las poblaciones *Ae. aegypti* de México, siendo las mutaciones V410L, V1016I y F1534C como las únicas

que a la fecha se han encontrado y asociado con la resistencia a piretroides en México (Saavedra et al. 2018; 2019).

Las mutaciones *kdr* son uno de los mecanismos más importantes en la resistencia a piretroides, y ha sido uno de los más documentados en artrópodos plaga y vectores de enfermedades en todo el mundo (Dong et al. 2014; Rinkevich et al. 2013). En el caso de *Ae. aegypti* la coocurrencia de estas mutaciones y su asociación con la resistencia a piretroides ha sido común en diferentes poblaciones a nivel mundial. Particularmente, la mayoría de los estudios moleculares y toxicológicos sobre la resistencia a piretroides en *Ae. aegypti*, involucra el uso de la permetrina como piretroide Tipo I y a la deltametrina como piretroide Tipo II (Chen et al. 2020). En nuestro trabajo, a diferencia de lo comúnmente utilizado, el piretroide Tipo I usado en nuestros ensayos fue bifentrina.

De nuestros resultados podemos destacar que se encontró el alelo mutante C1534 fijo en las poblaciones bajo estudio después de su exposición a las CL_{50} de bifentrina y deltametrina calculadas para cada población. La mutación F1534C fue reportada por primera vez en Vietnam en 2009 (Kawada et al. 2009), y posteriormente se encontró en Asia, Norte y Sur de América (Yanola et al. 2010; Harris et al. 2010; Aponte et al. 2013; Alvarez et al. 2015; Ponce et al. 2016; López et al. 2018; Saavedra et al. 2018, Villanueva et al. 2019). A la fecha se ha encontrado coocurriendo con otras mutaciones en distintas poblaciones naturales de *Ae. aegypti*. Por si sola se ha determinado que la mutación F1534C se asocia con bajos niveles de resistencia a piretroides, pero cuando está unida a otras mutaciones se asocia con altos niveles de resistencia a estos (Chen et al. 2020). En nuestro trabajo resulta interesante destacar que se encontró que el 7.1% de los mosquitos expuestos a bifentrina poseen solo la mutación F1534C no así las mutaciones V1016I y V410L, sin embargo, este porcentaje de mosquitos corresponde en su mayoría al fenotipo muerto por lo que es difícil incriminar por si sola a la mutación F1534C con la resistencia a este piretroide. En el caso de las poblaciones *Ae. aegypti* expuestas a deltametrina, encontramos que el 14.1% de los mosquitos analizados poseen solamente la mutación F1534C en combinación con los genotipos susceptibles VV1016/VV410, a diferencia del caso anterior este haplotipo se encontró dentro de ese 14.1% en el 51.8% de los fenotipados

mueritos y el 48.1% de los mosquitos activos y recuperados. Lo que nuevamente nos lleva a inferir que por sí sola esta mutación no tiene un impacto relevante en la resistencia a este piretroide.

En cuanto a la mutación V1016I, el genotipo homocigoto II1016 fue el que se encontró en mayor frecuencia, particularmente entre mosquitos fenotipados activos en las poblaciones de moderada y alta resistencia con alta recuperación. Esta mutación fue reportada por primera vez en 2007 en poblaciones mexicanas (Saavedra et al. 2007) y, comparados con estos y otros reportes, nuestros resultados demuestran un incremento en las frecuencias del alelo mutado I1016 encontrándose en algunas de las poblaciones bajo estudio en más del 90% de los mosquitos analizados. Esto también ha sido evidenciado en trabajos como el de Vera-Maloof y colaboradores (2015) quienes reportan un incremento de frecuencias cercana a cero a casi la fijación en 12 años.

Algunos trabajos reportan que por sí sola la mutación V1016I no altera la sensibilidad a los canales de sodio ante permetrina y deltametrina. Sin embargo, cuando esta se encuentra con la mutación F1534C la resistencia se incrementa con ambos tipos de piretroides (Chen et al. 2019). En nuestro estudio, no se encontraron individuos solo con la mutación V1016I, sino que todos los mosquitos analizados mostraron al menos 2 mutaciones coocurriendo en diferentes combinaciones haplotípicas. De hecho, el haplotipo CC1534/II1016/VV410 fue el menos frecuente entre los mosquitos analizados confirmando el poco impacto que tiene esta mutación aunada a la F1534C y en ausencia de la V410L sobre la resistencia a bifentrina y deltametrina.

En el caso de la mutación V410L, esta fue reportada recientemente en poblaciones *Ae. aegypti* de Brasil (Haddi et al. 2017) y posteriormente en México en 2018 (Saavedra et al. 2018), aunque sabemos que se ha encontrado en las poblaciones naturales previo a estos reportes. Esto con base a estudios realizados en colecciones de muestras colectadas en 2002. En estudios recientes, Villanueva et al. (2019) reportaron altas frecuencias del alelo L410 en poblaciones del estado de Veracruz, a saber, Minatitlán con 0.99, Poza Rica con 0.82 y José Cardel con 0.97, junto con poblaciones de Cancún en Quintana Roo con 0.93,

Frontera en Tabasco con 0.91 y Ciudad. del Carmen en Campeche con 0.86. La frecuencia del alelo L410 fue alta en todas las poblaciones de *Ae. aegypti* con valores aún más altos en poblaciones del sureste del país. En nuestro estudio, las frecuencias del alelo mutado fueron superiores al 50% entre mosquitos fenotipados vivos y recuperados en todas las poblaciones bajo estudio. Los antecedentes que se tienen con respecto a esta mutación es que al encontrarse en combinación con la mutación F1534C confieren grandes niveles de resistencia a permetrina, pero no a deltametrina (Fan et al. 2020). En contraste con este antecedente y como en el caso anterior, el haplotipo menos frecuente e incluso ausente en mosquitos expuestos a bifentrina fue CC1534/VV1016/LL410, indicándonos el poco impacto que tiene esta mutación en combinación con la mutación F1534C y con independencia de la V1016I.

Los alelos mutados I1016 y L410 se encontraron presentes entre las poblaciones del 15 al 60% y del 0 al 50%, respectivamente de los individuos de fenotipo muerto después de la exposición a deltametrina; mientras que los individuos de fenotipo activo presentaron los alelos mutados I1016 y L410 en frecuencias de 60 al 100% y 60 a 95%, respectivamente. Lo anterior similar a lo reportado por Saavedra y colaboradores (2018), un 100% de presencia del alelo mutado en el sitio 1534, mientras que un 70% de los individuos activos analizados presentaron el alelo mutado en los sitios 1016 y 410, esto en contraste con los individuos de fenotipo muerto donde el 85% presento los alelos susceptibles V1016 y V410; por lo cual podemos decir que existe relación en la presencia de los alelos susceptibles o resistentes en los sitios 1016 y 410, y el fenotipo expresado en los mosquitos frente a la exposición a piretroides.

La condición heterocigota en el sitio 1016 se encontró en mayor cantidad de individuos de fenotipo recuperado y muerto; mientras que el genotipo heterocigoto en el sitio 410 se encontró en mayor cantidad en individuos de fenotipo recuperado y activo. Saavedra et al. (2018) demostraron en bioensayos en botella con 25 µg de permetrina que los mosquitos con el genotipo homocigoto L410 mostraron solo un 7% de mortalidad, 64% en mosquitos heterocigotos y 90% en mosquitos homocigotos V410. Mientras que en nuestro estudio en las poblaciones donde se encontró la asociación significativa entre fenotipos y genotipos

de mosquitos expuestos a bifentrina, coinciden con los resultados de Saavedra et al. (2018) en donde obtuvimos porcentajes de muertos de 3% - 22% dentro del homocigoto mutado LL410, del 22% al 52% de heterocigotos y del 57% al 92% homocigotos VV410. En el caso de los mosquitos expuestos a deltametrina se encontraron porcentajes de mortalidad del 7 al 38% en homocigotos LL410, del 22 al 52% de mortalidad de heterocigotos y del 50 al 80% de mortalidad en homocigotos VV410.

Para el locus 1016 encontramos que en los mosquitos expuestos a bifentrina el porcentaje de mortalidad entre los homocigotos II1016 varió del 14 al 26%, los heterocigotos del 31 al 63% y para los homocigotos VV1016 del 81 al 100%. En mosquitos expuestos a deltametrina los porcentajes de muertos variaron del 5 al 24% en homocigotos II1016, del 16 al 46% en heterocigotos y del 47 al 74% de homocigotos VV1016.

De nuestro trabajo destacamos, además, que al asociar los fenotipos con los genotipos determinados en cada categoría para el locus 410 encontramos que existe una asociación significativa entre estos en los mosquitos de poblaciones de baja y moderada resistencia a bifentrina en ambos niveles de recuperación. Lo anterior al realizar un análisis de tablas de contingencia 3x3 (X^2 , $p \leq 0.05$). Inferimos que la asociación encontrada se debe a la alta proporción de heterocigotos encontrados entre los fenotipos activos y recuperados. Mientras que para el locus 1016, se encontró asociación entre fenotipos y genotipos en poblaciones con baja resistencia a bifentrina y alta recuperación y moderada resistencia a bifentrina con alta y baja recuperación. En este locus se observa que la asociación está dada por el elevado número de homocigotos mutantes en los fenotipos activos y recuperados. Una asociación similar la encontramos en los mosquitos expuestos a deltametrina, donde podemos inferir que esta obedece a la alta proporción de homocigotos mutantes y heterocigotos en los fenotipos activos y recuperados, así como, la alta proporción de homocigotos susceptibles entre mosquitos fenotipados como muertos.

De las 27 combinaciones genotípicas o haplotipos encontramos 7 distintas en los mosquitos expuestos a bifentrina y 9 entre los mosquitos expuestos a deltametrina. A diferencia de los reportado por Saavedra y colaboradores (2018) donde de las 27 combinaciones de

genotipos tri locus, se encontraron 20 en mosquitos recolectados entre 2000 y 2016, en poblaciones de Veracruz y Mérida. En ese trabajo los autores reportan que de 2002-2005, el genotipo triple susceptible FF1534/VV1016/VV410 era el más común con una frecuencia de 0,86, en 2012 ya no se detectó, y las combinaciones de genotipo más comunes fueron el homocigoto triple resistente CC410/II1016/LL410 (frecuencia = 0.47) y CC1534/VII1016 / VL410 (frecuencia = 0.34). En nuestro estudio la coocurrencia de las mutaciones *kdr* en su genotipo triple mutado CC1534/II1016/LL410 se encontró en mayor proporción en los individuos de fenotipo activo en poblaciones de Sinaloa, Nuevo León, Tamaulipas, Yucatán y Campeche, destacándose un 43% de los individuos de fenotipo muerto con la combinación CC1534/VV1016/VV410 en la población de Linares, NL.

La resistencia *kdr* es un rasgo autosómico, incompletamente recesivo controlado por un solo gen (Chang et al. 2012) que tiene importantes implicaciones para el estado de resistencia del heterocigoto. Chang y colaboradores (2012) esperaban que el heterocigoto en cada sitio mostrara un nivel de tolerancia a los insecticidas piretroides que no es mucho más alto que el de los individuos de tipo silvestre (susceptibles), lo cual se confirma en experimentos de cruzamiento realizados con las mutaciones S989P + V1016G o F1534C. Sin embargo, Plernsub et al. (2016) encontraron cierta mejora de la resistencia en el triple heterocigoto (S989P/V1016G/F1534C) que mostró una resistencia intermedia entre una cepa mutante homocigota 1534C y una cepa mutante homocigota 989P/1016G en Tailandia. Ishak y colaboradores (2015) demostraron un efecto similar en ausencia de S989P en *Ae. aegypti* en Malasia y concluyó que los heterocigotos V1016G y F1534C presentes en el mismo individuo tienen un efecto aditivo sobre la resistencia a la deltametrina del mosquito. En nuestro estudio se distingue la alta frecuencia del haplotipo resultado de la combinación CC1534/II1016/VL410 en mosquitos expuestos a bifentrina y fenotipados activos y recuperados. Mientras que en la exposición a deltametrina se distingue la frecuencia del haplotipo CC1534/VII1016/VL410 en la mayoría de los mosquitos analizados, sin embargo, al encontrarse en altas frecuencias entre los mosquitos de fenotipo muerto se descarta su contribución a la resistencia a deltametrina.

En el trabajo realizado por Saavedra y colaboradores (2018) reportaron 4 de 1,176 individuos con el genotipo CC1534/ VV1016/ LL410, es decir que 0.34% de los mosquitos analizados poseían los alelos L410 y C1534 ocurriendo independientemente (en ausencia de I1016), por lo que estos autores mencionan que esta condición se extinguió en las poblaciones mexicanas (Saavedra et al. 2018). En nuestro estudio este genotipo (CC1534/VV1016/LL410) fue encontrado en 1 de 1096 mosquitos analizados, es decir en el 0.09% del total analizado, lo cual demuestra el establecimiento de estas mutaciones a través del paso del tiempo.

La coocurrencia de mutaciones kdr encontrada en este estudio no es nueva pues ya en otras poblaciones *Ae. aegypti* de México se ha venido reportando, exhibiendo además importantes niveles de resistencia a piretroides Tipo I y II. Sin embargo, lo que es interesante resaltar de nuestro estudio es el incremento en las frecuencias de las combinaciones genotípicas trilocus asociadas a los alelos mutados.

Como hemos venido mencionando los reportes de estudios funcionales sobre el impacto de las mutaciones kdr sobre la sensibilidad de los canales de sodio a los piretroides desarrollados en oocitos de *Xenopus* han demostrado que cada mutación confiere diferentes niveles de resistencia a los piretroides Tipo I y II. Y particularmente es la combinación de estas la que se ha asociado con los mayores niveles de resistencia a distintos piretroides. Tal es el caso del trabajo realizado por Silva et al. (2021) en donde el alelo 410L + 1016I + 1534C confirió niveles más altos de resistencia a flumetrina, DCJW, cipermetrina 1R-cis α S y deltametrina, en relación con el alelo F1534C, lo que sugiere que la adición de las mutaciones V410L y / o V1016I a F1534C mejora la resistencia a estos insecticidas. En comparaciones de los alelos 989P + 1016G (KDR: ROCK) y 410L + 1016I + 1534C (LKR) se reveló que había niveles más altos de resistencia conferida por el alelo 989P + 1016G para once de los insecticidas piretroides probados. Para ciflutrina, flumetrina, alfa-cipermetrina, 1R-cis α S cipermetrina y deltametrina, los niveles de resistencia no fueron significativamente diferentes entre estos alelos.

Aun y a pesar de esta evidencia, se han generado reportes en donde se exhiben discrepancias entre los ensayos funcionales y los resultados en vivo. Por ejemplo, en estudios de expresión heteróloga, la mutación F1534C confirió insensibilidad a la permetrina, pero no a la deltametrina. Sin embargo, el alelo 1534C confiere resistencia a ambos permetrina y deltametrina in vivo. En este estudio se encontró además que el alelo 410L + 1016I + 1534C confiere niveles similares de resistencia al alelo 1534C a pesar de que la expresión heteróloga (Silva et al. 2019).

Otros trabajos encontraron que las mutaciones 410L + 1534C conferían una mayor insensibilidad a la permetrina que la mutación F1534C sola. Mientras que en otros muestran que la adición de V410L a F1534C no aumentó los niveles de resistencia a la permetrina (Haddi et al. 2017). En general, estas discrepancias apoyan la necesidad de cuantificar la resistencia conferida por diferentes mutaciones de kdr en vivo. Las posibilidades aquí son ahora bastante grandes, ya que el uso de herramientas de edición del genoma como CRISPR /Cas9 podría dar oportunidad a este tipo de análisis, como el impacto de estas mutaciones en múltiples escenarios de la biología de los mosquitos, por ejemplo, costos de aptitud física (Silva et al. 2021).

Lo que observamos en nuestros resultados y que concuerda con otros autores es que la frecuencia de la mutación F1534C en el 100% de los mosquitos analizados sugiere que esta condición puede tener un menor costo de aptitud en relación con los mosquitos con otros alelos asociados a la resistencia. Este hallazgo es apoyado por Plernsub y colaboradores (2016) quienes informaron que una cepa que tiene la mutación F1534C no tuvo reducciones de aptitud. Así también parecen similares a lo reportado en mosca doméstica donde kdr es común en algunas poblaciones, incluso aunque proporciona menos resistencia que otros alelos.

En lo reportado por Vera-Maloof y colaboradores en 2015, se estableció que el haplotipo V1016 + 1534C se incrementó de inicio, pero comenzó a disminuir cuando el doble homocigoto mutado 1016I + 1534C comenzó a aumentar. Además, se observaron diferencias en las frecuencias del haplotipo 1016I + F1534 en distintas poblaciones

mexicanas especulándose que la baja aptitud de 1016I + F1534 explica su rareza. También sugirieron que primero surgió el haplotipo V1016 + 1534C, seguido de 1016I + 1534C con una resistencia a piretroides aún mayor.

En un estudio en el que se examinaron nueve mutaciones en el *vgsc* (V410L, L982W, S989P, A1007G, I1011V /M, V1016G /I y F1534C) encontraron 33 patrones de secuencias en *Ae. aegypti* de 25 colecciones. De acuerdo con sus resultados los alelos 1534C y 989P + 1016G están ampliamente distribuidos en poblaciones asiáticas, mientras que en las poblaciones americanas predominaron 410L + 1016I + 1534C, seguido de 1534C. El análisis filogenético de *vgsc* sugiere múltiples orígenes independientes del alelo 1534C, uno de ellos establece que el alelo 410L + 1534C podría haber surgido por la acumulación de la mutación V410L en un individuo que ya tenía el alelo 1534C o por el cruce de los alelos 410L y 1534C. Así mismo, mencionan que tanto la recombinación como la acumulación secuencial de mutaciones han contribuido a la evolución molecular de mutaciones *kdr* en *Ae. aegypti* (Fan et al. 2020).

Basado en la cronología de los antecedentes sobre la detección de mutaciones *kdr*, los patrones de coocurrencia en las poblaciones de campo, aunado a los resultados de análisis funcionales, algunos autores han propuesto un modelo de selección secuencial para el V1016I y F1534C: la mutación V1016I (por sí sola no confiere resistencia a piretroides) probablemente surgió de la F1534C, lo que sugiere que el haplotipo y las mutaciones dobles se seleccionaron posteriormente porque confieren un nivel más alto de resistencia a piretroides (Chen et al. 2019; Vera - Maloof et al. 2015). A diferencia de V1016I, V410L por sí solo confiere resistencia tanto a permetrina y deltametrina, por lo que V410L podría seleccionarse independientemente de F1534C. Además, en el caso de mutaciones, como F1534C, V410L y V1016G, que están presentes en múltiples poblaciones en varias regiones, estas mutaciones pueden evolucionar independientemente de múltiples orígenes o resultar de un evento de origen único que luego se propago (Chung et al. 2019; Kawada et al. 2016; Saavedra et al. 2018). Mutaciones, como V1016G/I y F1534C, se identificaron a partir de poblaciones de mosquitos que también eran resistentes al DDT (Aponte et al. 2019; Ishak et al. 2015; Kawada et al. 2016; Saha et al. 2019) por lo que no se descarta que estas mutaciones se fueran seleccionando inicialmente debido al uso extensivo de DDT

para el control de mosquitos antes del uso de piretroides. En apoyo de este modelo, se ha confirmado que tanto F1534C como V1016G/I reducen la sensibilidad del canal de sodio al DDT (Chen et al. 2019).

Al buscar relacionar la coocurrencia de los polimorfismos encontrados con los resultados de los ensayos biológicos, encontramos coeficientes de determinación por encima del 90% con una significancia menor a 0.01 lo que indica una fuerte relación entre el haplotipo resistente y la RRCK₅₀ y la RRCL₅₀ dentro del fenotipo activo. Mientras que el haplotipo que involucra a los homocigotos mutados para C1534 y L410 con el genotipo heterocigoto V1016/I1016, se encontró una relación inversa; mientras más alta RR menos individuos con este haplotipo se encontrará entre los fenotipos activos. Otra relación encontrada se dio entre la frecuencia alélica I1016 y la frecuencia genotípica I1016/I1016 ambas con la RRCK₅₀ y la RRCL₅₀ obteniendo coeficientes de determinación superiores al 80% con valores de significancia menores a 0.01. Mientras que con los heterocigotos V1016/I1016 se encontró una relación inversa con respecto a la RRCK₅₀ y la RRCL₅₀ nuevamente con coeficientes de determinación superiores al 80% con valores de significancia menores a 0.01.

El desarrollo de la resistencia es un proceso continuo y complejo que depende de múltiples factores, y los resultados aquí expuestos muestran evidencia de ello. Por lo tanto, es importante la identificación de los mecanismos que la causan y realizar un monitoreo constante de estos, con el fin de detectar resistencia temprana, mejorar las estrategias de control operacional y obtener mejores resultados reflejados en la disminución de las enfermedades transmitidas por *Ae. aegypti* en México.

9. CONCLUSIONES

Se determinó la susceptibilidad de *Ae. aegypti* en poblaciones mexicanas mediante bioensayo de botella con bifentrina y deltametrina. Calculando la CK_{50} y CL_{50} , encontrando que todas las poblaciones bajo estudio fueron resistentes a estos, con valores $RRCK_{50}$ y $RRCL_{50}$ de 11 – 31 y 26 – 138, respectivamente.

Se determinaron los polimorfismos en el gen *para* del canal de sodio dependiente de voltaje a partir de los fenotipos: activos (resistentes al derribo), recuperados y muertos después de su exposición a la CL_{50} de bifentrina y la CL_{50} de deltametrina en poblaciones *Ae. aegypti* de México encontrando que el alelo mutante C1534 se encuentra fijo en la totalidad de las poblaciones bajo estudio, mientras que los alelos I1016 y L410 se encuentran presentes en un 63 – 100% y un 61 – 93%, respectivamente, esto en los mosquitos de fenotipo activo.

Se evaluó la relación entre la frecuencia de polimorfismos en el gen *para* del canal de sodio dependiente de voltaje en poblaciones *Ae. aegypti* de México y los resultados de bioensayos con bifentrina y con deltametrina. Se encontró una relación estadísticamente significativa, entre los genotipos encontrados en cada uno de los fenotipos asociados a la resistencia a deltametrina, mientras que en bifentrina solamente bajo las combinaciones fenotípicas triple mutantes.

Existe resistencia a los insecticidas bifentrina y deltametrina estrechamente relacionada con la presencia de mutaciones *kdr* en sus diferentes proporciones dentro de las poblaciones de *Ae. aegypti* de México bajo estudio.

10. PERSPECTIVAS

A partir de los resultados y análisis presentados en este trabajo, las perspectivas para estudios futuros se centran, por un lado, en la realización de ensayos biológicos con otros insecticidas piretroides que permitan incrementar el conocimiento asociado con la interacción de la proteína del canal de sodio dependiente de voltaje con la molécula del insecticida, en presencia de las mutaciones *kdr*. Así también, la inclusión de más variables experimentales como la exposición a sinergistas con el propósito de comparar el impacto de las mutaciones *kdr* con el uso de ingrediente activo versus formulación que incluye ingrediente activo y sinergista, así como, el uso de concentraciones diferentes de cada ingrediente activo, como puede ser la dosis diagnóstica utilizada para el monitoreo de resistencia.

Se recomienda el monitoreo continuo del nivel de resistencia a los insecticidas piretroides, así como los mecanismos involucrados en las poblaciones naturales del mosquito, a fin de integrar dicho conocimiento en los programas de manejo de la resistencia a insecticidas utilizados en salud pública.

11. BIBLIOGRAFIA

- Abbott WS. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18:265–267.
- Alvarez L C, Ponce G, Saavedra-Rodriguez K, Lopez B, and Flores A E. 2015. Frequency of V1016I and F1534C mutations in the voltage-gated sodium channel gene in *Aedes aegypti* in Venezuela. *Pest Management Science* 71(6):863–869.
- Amelia-Yap, Z H, Sofian-Azirun M, Chen C D, Wayan Suana I, Lau K W, Elia-Amira N M R, Haziqah R, Tiong K T, Yvonne A L L, Van L L. 2019. Pyrethroids use: Threats on Metabolic-Mediated Resistance Mechanisms in the Primary Dengue Vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 56(3):811–816.
- Aponte H A, Penilla R P, Dzul-Manzanilla F, Che-Mendoza A, López A D, Solis F, Manrique-Saide P, Ransond H, Lenhardt A, McCalld P J, Rodríguez A D. 2013. The pyrethroid resistance status and mechanisms in *Aedes aegypti* from the Guerrero state, Mexico. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 107(2): 226–234.
- Aponte A, Penilla R P, Rodríguez A D, and Ocampo C B. 2019. Mechanisms of pyrethroid resistance in *Aedes (Stegomyia) aegypti* from Colombia. *Acta Tropica* 191:146–154.
- Arias J, Martinez H, Sepulveda L, and Vasilieva O. 2015. Predator-prey model for analysis of *Aedes aegypti* population dynamics in Cali, Colombia. *International Journal of Pure and Applied Mathematics* 105(4):561-597.
- Ayres C F J, Seixas G, Borrego S, Marques C, Monteiro I, Marques C S, Gouveia B, Leal S, Troco A D, Fortes F, Parreira R, Pinto J, and Sousa C A. 2020. The V410L knockdown resistance mutation occurs in island and continental populations of *Aedes aegypti* in West and Central Africa. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 14(5):1–12.

- Barrera-Pérez, M. A., Pavía-Ruz, N., Mendoza-Mézquita, J. E., Torres-Arcila, N., Hernández-Hernández R, Castro-Gamboa F, Manrique-Saide P. 2015. Control de criaderos de *Aedes aegypti* con el programa Recicla por tu bienestar en Mérida, México. *Salud Publica de México* 57(3):201–210.
- Bregues C, Hawkes N J, Chandre F, McCarroll L, Duchon S, Guillet P, Manguin S, Morgan J C, and Hemingway J. 2003. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Medical Veterinary Entomology* 17: 87–94.
- Brogdon WG, McAllister JC. 1998. Insecticide resistance and vector control. *Emerging Infectious Diseases* 4:605–613.
- Brogdon W, Chan A. 2010. Guidelines for evaluating insecticide resistance in vectors using the CDC bottle bioassay. CDC technical report. *Methods in Anopheles research*, 2nd ed. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention.
- CENAPRECE (2021) Lista de Insumos Recomendados por el CENAPRECE para el combate de insectos vectores 2021. México. 2021.
https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/644651/Lista_de_Insumos_Recomendados_por_el_CENAPRECE_para_el_Combate_de_Insectos_Vectores_a_partir_2021.pdf
- Chang C, Shen W K, Wang T T, Lin Y H, Hsu E L, and Dai S M. 2009. A novel amino acid substitution in a voltage-gated sodium channel is associated with knockdown resistance to permethrin in *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39(4):272–278.
- Chauzat M, and Faucon J. 2007. Pesticide residues in beeswax samples collected from honeybee colonies (*Apis mellifera* L.) in France. *Pest Management Science* 1100–1106.

- Chen M, Du Y, Wu S, Nomura Y, Zhu G, Zhorov BS, Dong K. 2019. Molecular evidence of sequential evolution of DDT- and pyrethroid-resistant sodium channel in *Aedes aegypti*. PLoS Neglected Tropical Diseases 13(6): e0007432.
- Chen M, Du Y, Nomura Y, and Zhorov B S. 2020. Chronology of sodium channel mutations associated with pyrethroid resistance in *Aedes aegypti*. Archives of Insect Biochemistry and physiology 104(2):e21686.
- Chen T Y, Smartt C T, and Shin D. 2021. Permethrin resistance in *Aedes aegypti* affects aspects of vectorial capacity. Insects 12(1):1–12.
- Chung H H, Cheng I C, Chen Y C, Lin C, Tomita T, and Teng H J. 2019. Voltage-gated sodium channel intron polymorphism and four mutations comprise six haplotypes in an *Aedes aegypti* population in Taiwan. PLOS Neglected Tropical Diseases 13(3):e0007291.
- Coen E. 1982. Dynamics of Concerted Evolution of Ribosomal DNA and Histone Gene Families in the melanogaster Species Subgroup of *Drosophila*. BiOl, 158:17–35.
- Contreras-Perera Y, Ponce-García G, Villanueva-Segura K, Lopez-Monroy B, Rodríguez-Sánchez I P, Lenhart A, Manrique-Saide P, and Flores A E. 2020. Impact of deltamethrin selection on kdr mutations and insecticide detoxifying enzymes in *Aedes aegypti* from Mexico. Parasites and Vectors 13(1):1–22.
- Cosme L V, Gloria-Soriaid A, Caccone A, Powell J R, and Martins A J. 2020. Evolution of kdr haplotypes in worldwide populations of *Aedes aegypti*: Independent origins of the F1534C kdr mutation. PLoS Neglected Tropical Diseases, 14(4): 1–18.
- Da Graça Macoris M de L, Macoris Andrighetti M T, Rodrigues Nalon K de C, Camargo Garbeloto V, and Caldas Júnior A L. 2005. Standardization of bioassays for monitoring resistance to insecticides in *Aedes aegypti*. Dengue Bulletin 29:176–

- Dong K, Du Y, Rinkevich F, Nomura Y, Xu P, Wang L, Silver K, Zhorov B S. 2014. Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 50:1–17.
- Dusfour I, Zorrilla P, Guidez A, Issaly J, Girod R, Guillaumot L, Robello C, and Strode C. 2015. Deltamethrin resistance mechanisms in *Aedes aegypti* populations from three french overseas territories worldwide. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9(11): 1–17.
- Dusfour I, Vontas J, David J P, Weetman D, Fonseca D M, Corbel V, Raghavendra K, Coulibaly M B, Martins A J, Kasai S, Chandre F. 2019. Management of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses: Advances and challenges. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 13(10): 1–22.
- DOF 2015. NOM-032-SSA2-2014, Para la vigilancia epidemiologica, promocion, prevencion y control de las enfermedades transmitidas por vectores. DOF. Mexico: Diario Oficial de la Federacion 1–43.
- Fan Y, O’Grady P, Yoshimizu M, Ponlawat A, Kaufman PE, Scott JG. 2020 Evidence for both sequential mutations and recombination in the evolution of *kdr* alleles in *Aedes aegypti*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 14(4):e0008154.
- Field L, Emyr Davies T, O’Reilly A, Williamson M, and Wallace B. 2017. Voltage-gated sodium channels as targets for pyrethroid insecticides. *European Biophysics Journal* 46(7): 675-679.
- Flores A E, Reyes G, Fernández I, Sánchez F J, Ponce G. 2009. Resistance to permethrin in *Aedes aegypti* (L.) in northern Mexico. *Southwest Entomology* 34:167–77.

- Flores A E, Ponce G, Silva B, Gutierrez S M, Bobadilla C, Lopez B, Mercado R, Black IV W C. 2014. Wide spread cross resistance to pyrethroids in *Aedes aegypti* (L.) from Veracruz State Mexico. *Journal of Economic Entomology* 106(2): 959–969.
- Gómez García, Giovan Fernando. 2018. *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) y su importancia en salud humana. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 70(1):55-70.
- Haddi K, Tomé HVV, Du Y, Valbon WR, Nomura Y, Martins GF, Dong K, Oliveira EE. 2017. Detection of a new pyrethroid resistance mutation (V410L) in the sodium channel of *Aedes aegypti*: a potential challenge for mosquito control. *Science Report* 7:46549.
- Harris A F, Ranson H, and Rajatileka S. 2010. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 83(2):277–284.
- Hénault-Ethier Louise. 2016. Backgrounder: Pyrethroids — just because we can use them at home doesn't mean that they're harmless.
- Ishak I H, Jaal Z, Ranson H, and Wondji C S. 2015. Contrasting patterns of insecticide resistance and knockdown resistance (kdr) in the dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Malaysia. *Parasites & Vectors*, 8:181.
- Itokawa K, Yatsu K, Sekizuka T, and Maekawa Y. 2019. High-throughput genotyping of a full voltage-gated sodium channel gene via genomic DNA using target capture sequencing and analytical pipeline MoNaS to discover novel insecticide resistance mutations. *BioRxiv* 13(11):e0007818.
- Itokawa K, Furutani S, Takaoka A, Maekawa Y, Sawabe K, Komagata O, Tomita T, de Lima Filho J L, Alves L C, and Kasai S. 2021. A first, naturally occurring substitution

- at the second pyrethroid receptor of voltage-gated sodium channel of *Aedes aegypti*. Pest Management Science, 77(6): 2887–2893.
- Kandel Y, Vulcan J, Rodriguez S D, Moore E, Chung H N, Mitra S, Hansen I A. 2019. Widespread insecticide resistance in *Aedes aegypti* L. From New Mexico U.S.A. PLoS ONE 14(2):1–16.
- Kasai S, Caputo B, Tsunoda T, Cuong T C, Maekawa Y, Lam-phua S G, Vu T. 2019. First detection of a Vssc allele V1016G conferring a high level of insecticide resistance in *Aedes albopictus* collected from Europe (Italy) and Asia (Vietnam), 2016 : a new emerging threat to controlling arboviral diseases. Euro Surveill 24(5):1700847.
- Kushwah R B S, Dykes C L, Kapoor N, Adak T, and Singh O P. 2015. Pyrethroid Resistance and Presence of Two Knockdown Resistance (kdr) Mutations, F1534C and a Novel Mutation T1520I, in Indian *Aedes aegypti*. PLoS Neglected Tropical Diseases 9(1): e3332.
- Li C X, Kaufman P E, Xue R De, Zhao M H, Wang G, Yan T, Zhao T Y. 2015. Relationship between insecticide resistance and kdr mutations in the dengue vector *Aedes aegypti* in Southern China. Parasites and Vectors 8(1):1–9.
- Liu N. 2015. Insecticide Resistance in Mosquitoes: Impact, Mechanisms, and Research Directions. Annual Review of Entomology 60(1):537–559.
- Lopez B, Ponce G, González J A, Gutiérrez S M, Villanueva O K, González G, Bobadilla C, Rodríguez I P, Black W C 4th, and Flores A E. 2014. Susceptibility to chlorpyrifos in pyrethroid-resistant populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Mexico. Journal of Medical Entomology 51(3): 644–649.

- Lopez B, Ponce G, Flores A E, Gutiérrez S M, Villanueva O K, and Morales F. 2018. Frequency and intensity of pyrethroid resistance through the CDC bottle bioassay and their association with the frequency of kdr mutations in. *Pest Management Science* 74:2176-2184.
- Maestre-Serrano R, Pareja-Loaiza P, Gomez Camargo D, Ponce-García G, and Flores A E. 2019. Co-occurrence of V1016I and F1534C mutations in the voltage-gated sodium channel and resistance to pyrethroids in *Aedes aegypti* (L.) from the Colombian Caribbean region. *Pest Management Science* 75(6):1681–1688.
- Mazzarri M, and Georghiou G. 1995. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. *Journal of the American Mosquito Control Association* 11(3): 315-22.
- Mulyaningsih B, Umniyati S R, Satoto T B T, Ernaningsih E, and Nugrahaningsih D A A. 2018. Detection of Polymorphism on Voltage-gated Sodium Channel Gene of Indonesian *Aedes aegypti* Associated with Resistance to Pyrethroids. *The Indonesian Biomedical Journal* 10(3):250–255.
- OECD. 2018. Safety Assessment of Transgenic Organisms in the Environment Volume 8: OECD Consensus Document of the Biology of Mosquito *Aedes aegypti*, Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, OECD Publishing, Paris.
- Oliveira S, Caleffe R, and Conte H. 2017. Chemical control of *Aedes aegypti*: a review on effects on the environment and human health. *Revista Eletrônica Em Gestão, Educação E Tecnologia Ambiental*, 21(3):240.
- Parker C. 2020. Collection and rearing of container mosquitoes and a 24-h addition to the CDC bottle bioassay. *Journal of Insect Science* 20(6).
- Plernsub S, Saingamsook J, Yanola J, Lumjuan N, Tippawangkosol P, Walton C, and

- Somboon P. 2016. Temporal frequency of knockdown resistance mutations, F1534C and V1016G, in *Aedes aegypti* in Chiang Mai city, Thailand and the impact of the mutations on the efficiency of thermal fogging spray with pyrethroids. *Acta Tropica*, 162:125–132.
- Ponce G, Flores A E, Fernández-Salas I, Saavedra-Rodríguez K, Reyes-Solis G, Lozano-Fuentes S, Bond J G, Casas-Martínez M, Ramsey J M, García-Rejón J, Domínguez-Galera M, Ranson H, Hemingway J, Eisen L, and Black IV W C. 2009. Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in México. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3(10):e531.
- Ponce-García G, Del Río-Galvan S, Barrera R, Saavedra-Rodriguez K, Villanueva-Segura K, Felix, G, Amador M, Villanueva K and Flores A E. 2016. Knockdown resistance mutations in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Puerto Rico. *Journal of Medical Entomology* 53(6): 1410–1414.
- Rigau-pérez J G, Clark G G, Gubler D J, Reiter P, Sanders E J, and Vorndam A V. 1998. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 352(9132):971-977.
- Rinkevich F D, Du Y, and Dong K. 2013. Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. *Pesticide Biochemistry Physiology* 106(3): 93–100.
- Ryan S J, Mundis S J, Aguirre A, Lippi C A, Beltrán E, Heras F, Sanchez V, Borbor-Cordova M J, Sippy R, Stweart-Ibarra A M, Neira M. 2019. Seasonal and geographic variation in insecticide resistance in *Aedes aegypti* in southern Ecuador. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 13(6):1–18.
- Saavedra-Rodríguez K, Maloof F V, Campbell C L, Garcia-Rejon J, Lenhart A, Penilla P, Rodríguez A, Sandoval A A, Flores A E, Ponce G, Lozano S, and Black IV W C.

2018. Parallel evolution of *vgsc* mutations at domains IS6, IIS6 and IIIS6 in pyrethroid resistant *Aedes aegypti* from Mexico. *Scientific reports* 8(1):6747.
- Saavedra-Rodríguez K, Campbell C L, Lenhart A, Penilla P, Lozano-Fuentes S, and Black W C. 2019. Exome-wide association of deltamethrin resistance in *Aedes aegypti* from Mexico. *Insect Molecular Biology* 28(5):591–604.
- Shettima A, Ih I, H A H, and Othman N. 2020. A review: mosquito proteomics and its potential role in insecticide resistance detection. *International Journal of Mosquito Research* 7(4):112–117.
- Silva JJ, Scott JG. 2019. Conservation of the voltage-sensitive sodium channel protein within the Insecta. *Insect Molecular Biology* 29: 9–18.
- Silva JJ, Kouam CN, Scott JG. 2021. Levels of cross-resistance to pyrethroids conferred by the *Vssc knockdown resistance* allele 410L+1016I+1534C in *Aedes aegypti*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 15(7): e0009549.
- Sombié A, Saiki E, Yaméogo F, Sanon A, McCall P J, Shirozu T, Fukumoto S, Weetman D, Kanuka H, and Badolo A. 2019. High frequencies of F1534C and V1016I *kdr* mutations and association with pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Somgandé (Ouagadougou), Burkina Faso. *Tropical Medicine and Health* 47(1):4–11.
- Vera-Maloof F Z, Saavedra-Rodríguez K, Elizondo-Quiroga A E, Lozano-Fuentes S, and Black IV W C. 2015. Coevolution of the Ile1,016 and Cys1,534 Mutations in the Voltage Gated Sodium Channel Gene of *Aedes aegypti* in Mexico. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(12):1–22.
- Villanueva-Segura O K, Ontiveros-Zapata K A, Lopez-Monroy B, Ponce-Garcia G, Gutierrez-Rodriguez S M, Davila-Barboza J A, Mora-Jasso EJ, Flores A E. 2019. Distribution and Frequency of the *kdr* Mutation V410L in Natural Populations of

Aedes aegypti (L.) (Diptera: Culicidae) From Eastern and Southern Mexico. Journal of Medical Entomology, 57(1):218-223.

Villanueva-Segura K, Ponce-Garcia G, Lopez-Monroy B, Mora-Jasso E, Perales L, Gonzales-Santillan F, Ontiveros-Zapata K, Davila-Barboza J A, Flores A E. 2019. Multiplex PCR for simultaneous genotyping of kdr mutations V410L, V1,016I and F1,534C in *Aedes aegypti* (L.). BioRxiv 880195.

Vinícius V, Monteiro S, Navegantes-lima K C, Gomes R D S, Reis J F, Carlos L, and Hughes G L. 2019. *Aedes* – Chikungunya Virus Interaction : Key Role of Vector Midguts Microbiota and Its Saliva in the Host Infection. Frontiers in Microbiology 10:492.

Vontas J, Kioulos E, Pavlidi N, Morou E, Torre A, and Ranson H. 2012. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. Pesticide Biochemistry and Physiology 104(2):126–131.

Yaméogo F, Sanon A, McCall P J, Shirozu T, Weetman D, Sakurai T, Badolo A. 2019. High frequencies of F1534C and V1016I kdr mutations and association with pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Somgandé (Ouagadougou), Burkina Faso. Tropical Medicine and Health 47(1):4–11.

Yanola J, Somboon P, Walton C, Nachaiwieng W, Somwang P, and Prapanthadara L. 2011. High-throughput assays for detection of the F1534C mutation in the voltagegated sodium channel gene in permethrin-resistant *Aedes aegypti* and the distribution of this mutation throughout Thailand. Tropical Medicine & International Health 16(4):501– 509.

World Health Organization (WHO). 2018. Recommended insecticides for indoor residual spraying against malaria vectors. Geneva: World Health Organization;. https://www.who.int/neglected_diseases/vector_ecology/vector-control/Insecticides_IRS_22_September_2018.pdf?ua=1

World Health Organization (WHO). 2012. Global strategy for dengue prevention and control 2012–2020. Geneva: World Health Organization. <https://www.afro.who.int/publications/global-strategy-dengue-prevention-and-control-2012-2020>

World Health Organization (WHO). 2016. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes, in, 2nd edition ed. by World Health Organization. World Health Organization, Geneva, Switzerland, p. 48
<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241511575/en/>

World Health Organization (WHO). 2016. Monitoring and managing insecticide resistance in Aedes mosquito populations: interim guidance for entomologists in WHO/ZIKV/VC/161. World Health Organization, Geneva, Switzerland, pp. 1–11
<http://www.who.int/csr/resources/publications/zika/insecticide-resistance/en/>.